

**ÜBER DIE FUNKTION
DES AVIÄREN KALLIKREIN - KININ -
UND ANGIOTENSIN - RENIN - SYSTEMS
BEI DER AUSLÖSUNG
DER LUNGENATMUNG DES HUHNES**

Peter Schmidt

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

ÜBER DIE FUNKTION DES AVIÄREN KALLIKREIN - KININ - UND
ANGIOTENSIN - RENIN - SYSTEMS BEI DER AUSLÖSUNG DER
LUNGENATMUNG DES HUHNES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Peter Schmidt

aus

München

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

MEINEN ELTERN
UND
ANGELIKA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547928_0018

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Literatur	1
1.1. Allgemeines zum Gasaustausch	1
1.2. Bau und Funktion der Vogellunge	1
1.3. Entwicklung des aviären Atmungsapparates	3
1.4. Versorgung des Embryos mit Sauerstoff; Beginn der Lungenatmung beim Vogel	4
1.5. Das fetale Kreislaufsystem	6
1.6. Funktion der Atmung beim Schlupfgeschehen	7
1.7. Hormonelle Regulation der Lungenentwicklung	10
1.8. Bedeutung des Kallikrein - Kinin - und Renin - Angiotensin - Systems für Geburt und Einsetzen der Lungenatmung	12
1.9. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Reagentien	17
2.3. Isolierung von Ornithokallikrein aus dem Hühnerpankreas	18

	Seite
2.4. Messung der Proteasenaktivität der Pankreasfraktionen	19
2.5. SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese	20
2.6. Blutdruckmessung am erwachsenen Huhn	24
2.7. Applikation der Substanzen	25
2.8. Bestimmung der Kallikreinaktivität in der Lunge	26
2.9. Bestimmung der Kallikreinaktivität im Plasma und Vollblut	27
2.10. Hemmung der Proteasenaktivität	28
2.11. Bestimmung der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität in der Lunge	28
2.12. Bestimmung der Angiotensin-converting Enzymeaktivität im Plasma und Vollblut	30
2.13. Hemmung des Angiotensin-converting Enzyme	30
2.14. Bestimmung des Hämoglobingehalts der Lunge	31
2.15. Proteinbestimmung	31
2.16. Automatische Registrierung der Lungenatmung	32
2.17. Statistische Auswertung	33

	Seite
3.	Ergebnisse 34
3.1.	Charakterisierung des Ornithokallikreins und des Angiotensin-converting Enzyme 34
3.2.	Spezielle Untersuchung der pulmonalen Proteasenaktivität des Hühnerfetus 42
3.2.1.	Einteilung der verschiedenen Unter- suchungsstadien 46
3.2.2.	Verlauf der pulmonalen Kallikreinaktivität beim Hühnerfetus 47
3.2.3.	Verlauf der pulmonalen Hämoglobin- konzentration beim Hühnerfetus 51
3.2.4.	Verlauf der pulmonale Angiotensin- converting Enzymeaktivität beim Hühnerfetus 55
4.	Diskussion 65
5.	Zusammenfassung 76
6.	Summary 78
7.	Literaturverzeichnis 80

1. EINLEITUNG UND LITERATUR

1.1. Allgemeines zum Gasaustausch

Um die vielfältigen physikalischen und chemischen Lebensprozesse aufrechtzuerhalten, benötigt der Körper Energie, die er hauptsächlich aus dem oxidativen Abbau von Kohlenhydraten und Fetten bezieht. Dabei wird Sauerstoff verbraucht, der laufend wieder zugeführt werden muß.

Die Natur hat verschiedene Möglichkeiten entwickelt, der Zelle Sauerstoff zuzuführen.

Die Sauerstoffversorgung der Einzeller und Metazoa geschieht durch einfache Diffusion. Dieses Prinzip reicht bei den höher entwickelten Organismen nicht mehr aus, weil im Gewebe über einen Diffusionsprozeß nur eine Entfernung von maximal 1 mm überwunden werden kann (75). Es war daher ein neues System erforderlich, um den Gasaustausch aller Zellen mit der Außenwelt zu gewährleisten. Bei den höher entwickelten Organismen übernehmen diese Funktion das Blut, der Blutkreislauf und der Atmungsapparat. Dieses System ist bei allen höher entwickelten Lebewesen gleich angelegt, es haben sich jedoch im Laufe der Evolution verschiedene Modifikationen herausgebildet. Besonders interessant ist dabei das Atmungssystem des Vogels.

1.2. Bau und Funktion der Vogellunge

Die Vogellunge stellt in der stammesgeschichtlichen Reihe der Sauropsiden die höchste Stufe der Entwicklung dar. Andererseits unterscheidet sie sich in wesentlichen Merkmalen vom Atmungssystem der Säuger.

So machen die ungelappten Vogellungen nur etwa 0.6% des gesamten Körpergewichts aus. Durch die Tatsache, daß die

Lungen allseitig mit dem Cavum pulmonale verwachsen sind, und außerdem kein Zwerchfell ausgebildet ist, ist die Bewegungsfähigkeit der Vogellunge bei der Atmung stark eingeschränkt. Außerdem kommt hinzu, daß die Lungen des Vogels im craniodorsalen Viertel der Leibeshöhle lokalisiert sind, in einem Bereich, in dem Bewegungen nur noch in einem kleinen Umfang möglich sind. Dennoch reicht der Gaswechsel aus, um den sehr aktiven Stoffwechsel dieser Tierart aufrechtzuerhalten; dies ist auf den Feinbau der Vogellunge zurückzuführen.

Während beim Säuger nämlich der Gasaustausch in blind endenden respiratorischen Endstücken, den Alveolen stattfindet, erfolgt er beim Vogel in einem Labyrinth von röhrenartigen Hohlräumen, den Luftkapillaren, die miteinander anastomosieren. Diese sind wie die Alveolen der Säuger mit einer einfachen Lage von Endozyten ausgekleidet (72). Die lamellenförmigen Ausläufer des respiratorischen Epithels wie auch das Endothel der Kapillaren sind jedoch noch dünner als in der Säugerylunge, so daß die Dicke der gesamten Blut-Luft-Barriere nur etwa 70 nm beträgt (89,92).

Als weitere besondere Einrichtung der Vogellunge sind die Luftsäcke zu erwähnen. Sie stellen die extrapulmonale Fortsetzung des Bronchialbaumes dar.

Nur etwa 30-50 % der eingeatmeten Luft gelangt via Parabronchien in die Luftkapillaren. Der restliche Luftanteil gelangt direkt unter Umgehung des respiratorischen Gewebes in die Luftsäcke. Bei der Ausatmung kann diese in den Luftsäcken vorhandene, sauerstoffreiche Luft über die Tertiärbronchien und Luftkapillaren noch einmal dem Gasaustausch zur Verfügung stehen.

Der Entwicklung miteinander anastomosierender Kanalsysteme - Tertiärbronchien, Luftkapillaren - sowie der hohen

Kapillardichte der Vogellunge und der sehr dünnen alveolokapillären Membran ist es zuzuschreiben, daß die kleine Vogellunge einen relativ zum Körpergewicht größeren Gasaustausch als die Säugerlunge gestattet (92).

1.3. Entwicklung des aviären Atmungsapparates

Organe wie Leber und Nieren übernehmen schon praenatal ihre eigentliche Funktion, weshalb sie schon frühzeitig angelegt und differenziert werden. Die Lunge entwickelt sich dagegen recht langsam (27). Beim Hühnerembryo wächst sie am vierten Inkubationstag aus dem Lungenknospenstadium heraus in die craniodorsale Pleuroperitonealhöhle. Aus dem Primärbronchus entsprossen die Sekundärbronchen und daraus entwickeln sich ab dem 10. Inkubationstag die Tertiär- oder Parabronchen. Letztere wachsen aufeinander zu, anastomosieren und bilden so ein dreidimensionales Netzwerk (27).

Die Entwicklung des Luftsacksystems geht mit der Entwicklung des postpulmonalen Septums einher. Dieses stellt am 8. Inkubationstag eine Erweiterung des transversen Septums dar, welches aus der Kaudalwand des Perikards und dem Dottersackstiel entstammt.

Das postpulmonale Septum bedeckt die Ventralfläche der Lunge. In dieses Septum hinein sprossen, abgesehen vom Abdominalluftsack, die Luftsäcke und spalten es in das Septum horizontale und in das Septum obliquum (27).

Die Entwicklung des Lungengefäßsystems geht mit der Entwicklung der Parabronchen einher (27). Diese haben zu Beginn des letzten Entwicklungsdrittels ihre endgültige Anzahl und Lage erreicht und beginnen ab diesem Zeitpunkt mit der Bildung von Atrien und Infundibula in das umgebende Mesenchym. In diesem Mesenchym zwischen den

Parabronchen befindet sich eine große Anzahl von Arteriolen und kleinen Venolen. Erst mit Beginn der Belüftung des Luftsack- und Bronchialsystems entwickelt sich aus den Infundibula die große Anzahl der Luftkapillaren. Gleichzeitig erhöht sich die Anzahl der Kapillaren zwischen den Arteriolen und Venolen, so daß letztlich gemeinsam mit den Luftkapillaren das dreidimensionale Gaswechselsystem der Vogellunge entsteht.

1.4. Versorgung des Embryos mit Sauerstoff; Beginn der Lungenatmung beim Vogel

Während der fetalen Entwicklung steht die Lunge nicht als Gaswechselorgan zur Verfügung. Deshalb mußten sich andere Möglichkeiten der Sauerstoffversorgung des Fetus herausbilden.

In den ersten Tagen der Inkubation reicht der Vorgang der Diffusion aus, um dem noch kleinen Embryo einen angemessenen Gaswechsel zu gestatten. Der steigende Sauerstoffbedarf des wachsenden Embryos fordert dann aber die schnelle Entwicklung eines Gefäßsystems für den Gasaustausch (27). Dies wird durch die Ausbildung der Chorioallantoisgefäße erreicht. Das Gefäßsystem der Chorioallantois, bestehend aus den zwei Allantoisarterien und der Allantoisvene, wächst in der Zeit vom 5. bis zum 11. Tag sehr schnell, um sich dann bis zum 20. Tag nur noch langsam weiter zu entwickeln. Die Kapillaren dieses Gefäßsystems, die bis zum 10. Inkubationstag unter dem zweischichtigen Chorionepithel liegen, werden bis zum 12. Tag in dieses Epithel hineingelagert. Die Chorioallantoisgefäße übernehmen die Sauerstoffversorgung des Fetus bis zum 19. Inkubationstag, um dann bis zum Schlupf allmählich zu versiegen (27,106). Die Chorioallantois entspricht also, in Bezug auf den Gaswechsel, der Plazenta der Säugetiere. Dem Gasaustausch zwischen Chorioallantoisgefäßen

und Außenwelt sind die beiden Schalenmembranen und die Eischale dazwischengeschaltet.

Nach Wangensteen et al. (111) ist dabei der Diffusionswiderstand der Schalenmembranen von untergeordneter Bedeutung. Der Gasaustausch ist vielmehr abhängig von der Größe und Anordnung der Poren der Eischale. Diese entstehen im Verlauf der Schalenbildung durch unvollständige Anordnung der Calcitkristalle (96,97) und erlauben beim Hühnerei einen Sauerstofftransport von etwa 600 ml/Tag (110,112).

Die Anpassung an den steigenden Sauerstoffbedarf des wachsenden Vogelfetus geschieht über einen ansteigenden Chorioallantoisblutfluß, einen erhöhten Erythrozyten- und Hämoglobingehalt sowie über eine erhöhte Sauerstoffaffinität des fetalen Hämoglobins (34,78,95). Die Kapazitätsgrenze dieses Systems scheint beim Huhn aber am 16. Tag erreicht zu sein (54), da ab diesem Zeitpunkt der Sauerstoffverbrauch bis zum Einsetzen der Lungenatmung stagniert.

Die Respiration beginnt etwa 24 Stunden vor dem Schlupf (80,118). Während beim Säuger die Lunge mit der Unterbrechung des fetoplacentalen Kreislaufs bei der Geburt durch das Reißen der Nabelschnur unverzüglich ihre Funktion als Gaswechselorgan übernehmen muß, um eine neonatale Asphyxie und dadurch eine Hirnschädigung zu vermeiden (74), erfolgt beim Vogel der Übergang zur Lungenatmung noch innerhalb des Eies. Sie setzt nach Romijn (79) ein, wenn der Schnabel in die Luftkammer eintritt. Vince (101) konnte aber zeigen, daß das Luftsacksystem schon zu einem Zeitpunkt Luft enthält, zu dem die Membran zwischen Ei und Luftkammer noch unversehrt erscheint, und die Lungenschwimmprobe noch negativ verläuft. Sie erklärt damit die Fähigkeit zur Lautäußerung schon vor dem Einsetzen der eigentlichen Atemtätigkeit (104). Atembewegungen treten also kurz vor oder nach dem Durchtrennen der Membran zur

Luftkammer auf (101).

Die Lungenatmung des Vogelfetus setzt nicht schlagartig ein, sondern stellt einen allmählich fortschreitenden Prozeß dar (104), der sich in einem nur langsamen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs widerspiegelt (32,106).

Die Chorioallantoisgefäße bleiben auch nach dem Einsetzen der Lungenatmung noch aktiv und degenerieren erst nach dem Anpicken vollständig (106). Ab diesem Zeitpunkt hat der Fetus die Möglichkeit, atmosphärische Luft zu atmen; von da ab übernimmt die Lunge den Gaswechsel zunehmend (106). Somit hat der Vogel in der Zeit vom Eintreten des Schnabels in die Luftkammer bis zum Schlupf die Möglichkeit, Sauerstoff sowohl über das Gefäßsystem der Chorioallantois als auch über die Lungenatmung aufzunehmen.

Diese von Romijn (80) als "parafetal" bezeichnete Phase ist dadurch charakterisiert, daß die Lungenatmung immer effektiver wird, während die Kapazität der Chorioallantoisgefäße mehr und mehr abnimmt. Ihre Dauer wird für das Haushuhn mit 24 Stunden (80,110), für die Möve mit ca. 3 Tagen (26) und für die Ente mit ca 3 1/2 Tagen (47) angegeben.

1.5. Das fetale Kreislaufsystem

Der Verlauf der fetalen Zirkulation wurde vor allem beim Säuger eingehender studiert (61,82).

Die Arteriae umbilicales führen venöses Blut zu den Gefäßen der Chorioallantois, wo es zum Gasaustausch kommt. Das arterialisierete Blut sammelt sich in den Nabelvenen und strömt zu etwa 50 % unter kapillärer Auflösung durch die fetale Leber. Die andere Hälfte gelangt als "bypass" über den Ductus venosus in die Vena cava caudalis, wo es

sich mit venösem Blut aus den Baueingeweiden und den Organen der unteren Körperhälfte vermischt. Etwa ein Drittel dieses Mischblutes gelangt über das Foramen ovale aus dem rechten in den linken Vorhof des Herzens und umgeht dadurch als "via sinistra" die Lunge (52). Zwei Drittel des Blutes aus der V. cava caudalis gelangen über das rechte Herz in die A. pulmonalis. Wegen des großen Widerstandes im Lungengefäßsystem des Embryos ist der Druck in der A. pulmonalis größer als in den systemischen Arterien. Deshalb gelangt der größte Teil dieses Blutes über den Ductus arteriosus direkt in die Aorta descendens. Insgesamt gelangen also etwa 70% des gesamten Herzschlagvolumens in die Aorta descendens, 20 % in die brachiocephalen Gefäße, 3 % in die Herzkranzgefäße und nur etwa 7 % in das Lungengefäßsystem (83).

1.6. Funktion der Atmung beim Schlupfgeschehen

Das "Geborenwerden" des Vogels, der Schlupf, unterscheidet sich grundsätzlich von der Geburt des Säugers. Er stellt nämlich einen rein aktiven Vorgang des Fetus dar, der die Entwicklung eines koordinierten Bewegungsablaufes schon in ovo voraussetzt(49,101,103,120). Hamburger und Oppenheimer haben die Entwicklung der fetalen Motilität beim Huhn in drei Phasen eingeteilt (49). Während in Phase I und II noch recht unkoordinierte Bewegungen ablaufen, die sich in ihrer Intensität allmählich steigern, beginnen die koordinierten Bewegungen der Phase III, die letztlich zum Schlupf führen, nach Vince (98) am 17. Tag. Dabei wird der Kopf des Embryos unter dem Dottersack emporgehoben, der Schnabel wird aufwärts in Richtung zur Luftkammer geführt und um den 20. Tag, dem Beginn der Lungenatmung, wird die Membran zur Luftkammer durchstoßen. Etwa 12 Stunden später wird die Schale selbst eröffnet (107). Diese angepickte Stelle wird im weiteren Verlauf entgegen dem Uhrzeigersinn

erweitert (49). Sobald die Eischale zu etwa drei Viertel eröffnet ist, kann der Schlupf durch Absprengen des letzten Schalenrestes erfolgen.

Die Atmung des Vogels setzt bereits in der pränatalen Phase, also noch im Ei ein. Die Meinungen in der Literatur über die Bedeutung dieses Phänomens für das Schlupfgeschehen sind nicht einheitlich.

Während Vince (100) in der gesteigerten Motilität vor dem Schlupf einen entscheidenden Auslöser der Lungenatmung sieht, konnten Wittmann et al. in ihren Untersuchungen über Motilitäts- und Atmungsmuster des Vogelembryos (120) nachweisen, daß die zum Schlupf führende Motilitätszunahme erst dann einsetzen kann, wenn die Lungenatmung bereits stabilisiert ist. Die in einer Phase reduzierter Aktivität einsetzende Lungenatmung sichert nämlich erst die für die gesteigerte Motilität notwendige Sauerstoffversorgung (120). Nach Wittmann et al. stellt somit die Atmung erst die eigentliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Schlupf dar. Dafür sprechen auch ihre Untersuchungen mit thioharnstoffbehandelten Feten. Diese zeigten, daß Feten, bei denen die Atmung verspätet einsetzte, noch schlüpfen konnten, während Tiere, deren Atmung vollkommen unterdrückt worden war, nicht mehr schlüpften.

Über die Faktoren, die die Lungenatmung beim Vogel auslösen, ist im Gegensatz zum Säuger noch recht wenig bekannt. Beim Säugetier wird dabei, neben einer gesteigerten Sympathikusaktivität, der Zusammensetzung der Atemgase im Blut mit ihrer Wirkung auf das medulläre Atemzentrum und auf die peripheren Chemorezeptoren eine große Bedeutung zugeschrieben (11).

Während beim Säuger bis etwa 15 Minuten vor der Geburt relativ konstante Druckverhältnisse der Atemgase im Blut bestehen, und erst zu diesem Zeitpunkt der arterielle Sauerstoffpartialdruck fällt, bzw. der arterielle Kohlen-

dioxidpartialdruck stark ansteigt (13), erfolgen diese Veränderungen im Blut des Vogelfetus viel abgestufter. Schon ab dem 11.-12. Inkubationstag, also 7 Tage vor dem Einsetzen der Lungenatmung, ist ein Anstieg der arteriellen Kohlendioxidspannung feststellbar. Dieser Anstieg ist am 18. Tag am größten und fällt dann bis etwa 1 Tag vor dem Einsetzen der Atmung wieder leicht ab (21,34,94). Beim Einsetzen der Respiration, etwa 24 Stunden vor dem Schlupf, ist der Kohlendioxidpartialdruck in der Luftkammer mit etwa 50 mm Hg besonders hoch (79,108,118). Durch das praenatale Einsetzen der Atmung steigt er dann bis zum Anpicken noch an, während der Sauerstoffgehalt weiter absinkt. Mit dem Anpicken kommt es nochmals zu einem sprunghaften Anstieg des Sauerstoffverbrauchs (105,106). Vince (102) schließt daraus, daß ein hoher arterieller Kohlendioxidpartialdruck zwar ein Faktor, aber nicht der einzige Stimulus für die Atmung des Hühnerfetus ist. Eine hohe Kohlendioxidspannung scheint nicht alleine verantwortlich für den Beginn der Atmung zu sein.

Windle und Barcroft konnten Atembewegungen beim Hühnerembryo am 13. bis 20. Inkubationstag durch Erhöhen des Kohlendioxidgehalts in der Atmosphäre, bzw. durch Zerstören der Chorioallantois (118) provozieren. Andere Autoren hingegen konnten durch ein künstliches Erhöhen der Kohlendioxidkonzentration in der Luftkammer durch Abdecken der Eischale über der Luftkammer mit Paraffin (106,107,108) oder mit Ponal^R (123) lediglich das Kohlendioxid/Sauerstoff-Verhältnis in der Luftkammer zugunsten eines erhöhten Kohlendioxidpartialdrucks verändern, ohne aber den Zeitpunkt des Atmungsbeginns und den Schlupftermin vorzuverlegen. Der Zeitpunkt des Anpickens konnte dabei aber um etwa 6-8 Stunden beschleunigt werden.

Wittmann und Weissenbeck (123) schließen daraus, daß auch bei einem erhöhten Kohlendioxidpartialdruck in der Luftkammer die Sauerstoffversorgung des Embryos über die Chorioallantoisatmung unter der restlichen Eischale

aufrechterhalten werden kann. Erst nach dem Einsetzen der Lungenatmung, die dann immer effektiver wird und allmählich die Funktion der Chorioallantois übernimmt, stimuliert ein höherer Kohlendioxidgehalt in der Luftkammer das Anpicken der Eischale (107).

Beim Säuger beeinflussen neben der veränderten Zusammensetzung der Atemgase auch andere Stimuli wie Kälte, Berührung, Schmerz, Licht, Geräusche und Schwerkraft das respiratorische Verhalten des Neugeborenen. Beim Vogel üben vor allem die Lautgebung und die Motilität von Nachbarfeten einen Einfluß auf das Schlupfgeschehen aus (64,98). So haben Untersuchungen von Vince gezeigt, daß Bewegungen und akustische Signale der am weitesten entwickelten Feten eines Geleges den Schlupfprozeß stimulieren können (33,98,99,100,103). Diese Signale entstehen bei jedem Atemzug, gehen mit dem Eröffnen der Eischale und dem Einziehen des Dottersackes einher und dauern bis etwa 1-2 Stunden vor dem Schlüpfen an. Aber auch künstliche Klicklaute im Abstand von 3 Sekunden können den Schlupf beschleunigen, indem die koordinierten Bewegungen, die zum Schlupf führen, eher auftreten, und die Herz- und Atemfrequenz von Hühnerfeten am 20. Bebrütungstag forciert werden (103).

1.7. Hormonelle Regulation der Lungenentwicklung

Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden bisher hauptsächlich am Säuger durchgeführt. Dabei interessierte in erster Linie die hormonelle Regulation der Surfactantausbildung.

Bei der Synthese des Surfactant in den Typ II Pneumozyten des Alveolarepithels kommt der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse eine große Bedeutung zu (8,9,17,63). So treten osmophile Körperchen, die als morphologisches

Äquivalent der Surfactantbildung angesehen werden, unter dem Einfluß von Cortison eher auf. Nach Dekapitation fetaler Ratten und Kaninchen wurde ein verminderter Surfactantgehalt festgestellt (8,9), der durch Zugabe von ACTH (12,67) wieder ausgeglichen werden konnte.

Inzwischen hat diese Erkenntnis auch in der klinischen Anwendung der Corticoide Einzug gehalten. So werden sie z.B. beim "respiratory distress syndrome" (RDS) Neugeborener, welches mit einer mangelhaften Ausbildung des Surfactant einhergeht, therapeutisch eingesetzt.

Ein weiterer Hinweis, daß Corticosteroide in der fetalen Lunge eine Funktion haben, wird auch aus dem Nachweis cytoplasmatischer und nukleärer Rezeptoren für Cortisol und Dexamethason in der Lunge ersichtlich (4,33,42,43). Die Zahl dieser Rezeptoren steigt bis zur Geburt an und nimmt dann allmählich wieder ab (42).

Neben Rezeptoren für Corticosteroide wurden beim Säuger auch solche für Schilddrüsenhormone in den fetalen Lungenzellen nachgewiesen (62,68). Ähnlich wie Corticoide beschleunigen auch Thyroide die Reifung des Surfactant-systems (77,81,91,124). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß bei der "hyaline-membrane-disease" des neugeborenen Menschen verminderte T_3 - und T_4 -Spiegel im Nabelblutplasma gefunden wurden (14).

Beim Vogel ist über hormonelle Einflüsse auf das Schlupfgeschehen noch wenig bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, daß Schilddrüsenhormone die Atmung stimulieren, während ihre Antagonisten, die Goitrogene, diese Ereignisse verzögern (50,120,122).

1.8. Bedeutung des Kallikrein-Kinin- und Renin-Angiotensin- systems für Geburt und Einsetzen der Lungenatmung

Seit einiger Zeit wird dem Kallikrein-Kinin- und dem Renin-Angiotensin-System eine entscheidende Bedeutung bei der Lungenreifung und der Anpassung des Fetus an die veränderten Kreislaufbedingungen bei der Geburt zugeschrieben. Das Zusammenspiel dieser beiden Systeme verdeutlicht Abb. 1.

Kallikrein wurde erstmals 1930 von Kraut, Frey und Werle (57) im Pankreas entdeckt. Deshalb hat dieses Enzym seinen Namen von der griechischen Bezeichnung für Bauchspeicheldrüse erhalten.

Kallikreine sind Serin-Proteasen, die vasoaktive Peptide von Kininogenen durch limitierte Proteolyse freisetzen, gegenüber anderen Proteinen aber keine oder nur geringe proteolytische Aktivität aufweisen (29,30).

Beim Säuger existieren zwei Erscheinungsformen des Kallikreins, nämlich das Plasmakallikrein und das Gewebekallikrein. Während das Plasmakallikrein vor allem in das System der Blutgerinnungskaskade einbezogen ist (70), kommen dem Gewebekallikrein regulatorische Funktionen bei der intestinalen Absorption, der Glucose- und Aminosäureaufnahme in die Muskulatur und bei der Spermio-genese (40) zu. Schließlich wird auch ein Zusammenhang zur Nierenfunktion und Blutdruckregulation (73) diskutiert.

Das Plasmakallikrein spaltet vom Kininogen hydrolytisch eine Lysyl-Arginyl-Bindung, wodurch das Nonapeptid Bradykinin gebildet wird. Gewebekallikrein spaltet im Kininogen die Methionyl-Lysyl-Bindung und setzt somit das Dekapeptid Kallidin frei.

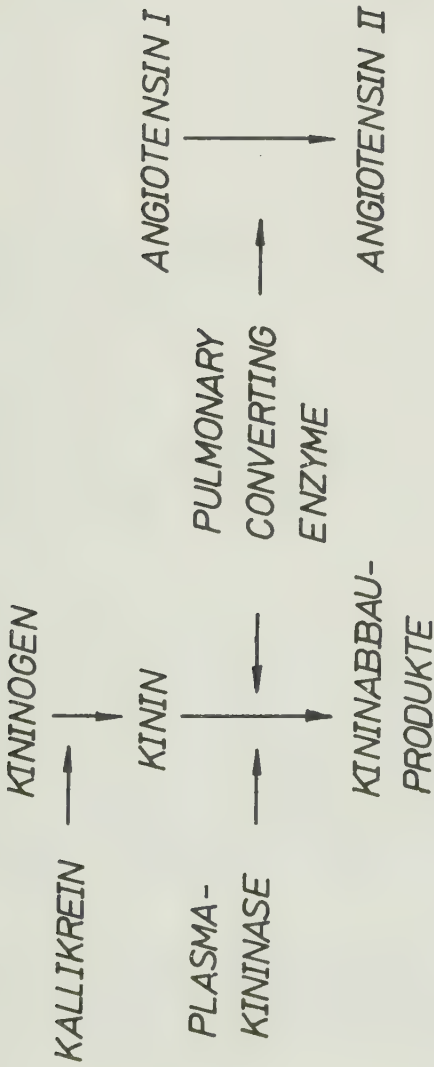


Abb. 1: Das Kallikrein - Kinin und Angiotensin - Renin - System
vereinfacht nach Mellins et al. (65)

Bradykinin weist die Aminosäuresequenz H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH auf und hat ein Molekulargewicht von 1060 Dalton, während Kallidin einen Lysinrest mehr und somit ein Molekulargewicht von 1188 Dalton besitzt. Diese Polypeptide sind durch folgende Wirkungen gekennzeichnet:

- Vasodilatation
- Kontraktion der glatten Muskulatur
- Steigerung der Kapillarpermeabilität
- Bronchokonstriktion
- Schmerzerzeugung

Dabei steht die Wirkung auf den Blutkreislauf im Vordergrund.

Bei der Geburt des Säugers wird dem Kallikrein-Kinin-System eine regulatorische Funktion bei der Veränderung der Gefäßwiderstände beim Einsetzen der Atmung zugeschrieben (1,10,44,52).

Das Kallikrein der Vögel, das Ornithokallikrein, unterscheidet sich vom Kallikrein der Säugetiere. Es setzt aus dem Vogelkininogen das Ornithokinin frei, das ein wesentlich höheres Molekulargewicht (6184 d) als das Säugerkinin Bradykinin besitzt (116).

Ebenso wie das Kallikrein der Säugetiere verursacht das Ornithokallikrein, intravenös verabreicht, eine Blutdrucksenkung (115). Es hat sich aber gezeigt, daß Ornithokallikrein beim Säuger bzw. Säugerkallikrein beim Vogel keine Wirkung zeigen (116). Beiden gemeinsam ist aber die Hemmbarkeit durch Aprotinin (Trasylol^R), dem polyvalenten Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen, während sie durch Sojabohnentrypsininhibitor, der andere trypsin-ähnliche Proteasen hemmt, nicht beeinflusst werden (36).

Auch beim Abbau des vasoaktiven Bradykinins kommt der metabolischen Aktivität der Lunge eine wichtige Funktion zu. Während nämlich nur maximal 30 % der Kinine von den

Kininasen des Serums inaktiviert werden, erfolgt der Hauptabbau bei der Lungenpassage (31). Es handelt sich hierbei um die Aktion einer Dipeptidylcarboxypeptidase, dem Angiotensin-converting Enzyme, welches erstmals 1954 von Skeggs im Pferdeblut nachgewiesen werden konnte (90). Dieses Enzym übernimmt im Organismus eine Doppelfunktion, nämlich Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II durch Abspaltung des C-terminalen Histidyl-Leucin-Restes und Inaktivierung der Kinine durch Hydrolyse am Carboxylende (3,71,84), wobei Bradykinin ein besseres Substrat zu sein scheint, als Angiotensin I (25).

Wie immunhistochemische (85) und fluoreszenzmikroskopische (117) Untersuchungen zeigten, ist dieses Enzym nicht wie das Kallikrein innerhalb der Zelle lokalisiert, sondern an der luminalen Oberfläche der Plasmamembran von Endothelzellen. Wigger und Stalcup (117) konnten das Angiotensin-converting Enzyme schon ab dem 2. Drittel der Gravidität in der fetalen Kaninchenlunge nachweisen, wenn diese sich noch in der tubulären Phase befindet. Die zunehmende Vaskularisierung der Lunge, besonders im letzten Drittel der Gravidität, geht dabei mit einer starken Zunahme der Enzymaktivität einher.

Auch Friedli et al (38) bezeichnen die Inaktivierung von Bradykinin als eine Lungenfunktion, die sich in der späten fetalen Entwicklung ausbildet.

Neben dem Angiotensin-converting Enzyme werden auch noch Aminopeptidasen und Endopeptidasen in der Lunge diskutiert, denen aber beim Abbau der Kinine keine große Bedeutung zukommt (31).

1.9. Zielsetzung

Es gibt viele Hinweise für die Bedeutung des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems bei der physiologischen Anpassung des Kreislaufsystems zum Zeitpunkt der Geburt des Säugetieres (31,52,66,69,76). Diesbezügliche Untersuchungen sind beim Vogel bisher nicht durchgeführt worden.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Einblick in das Kallikrein-Kinin- und Angiotensin-Renin- System des Vogelfetus' zum Zeitpunkt des Schlupfes zu erhalten. Dazu war es auch erforderlich, das Ornithokallikrein zu charakterisieren.

Gerade der Vogelembrryo bietet sich hierfür wegen seiner leichten Zugänglichkeit, der langen Dauer der "parafetalen Phase" und der langsam voranschreitenden Entfaltung der Lunge als besonders geeignetes Untersuchungsobjekt an.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden mit Feten der Rasse "Braunes Leghorn" durchgeführt. Die Eier wurden vom Geflügelhof Breitenau (Dachau) bezogen und im Inkubator bei $37 \pm 5^{\circ} \text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 - 67 % bebrütet.

2.2. Reagentien

L-Thyroxin wurde von der Firma Henning, Berlin, Captopril von der Firma van Heyden, Regensburg, und Aprotinin (Trasylol) sowie das Substrat N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-arginine Ethyl Ester (AcPheArgOEt) zum Kallikreinnachweis von Prof. H. Fritz und Dr. R. Geiger aus der Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Thioharnstoff wurde von der Firma Merck AG, Darmstadt, Dexamethason (Voren^R) von der Firma Boehringer, Ingelheim, und Holzleim (Ponal^R) von der Firma Henkel, Düsseldorf, bezogen. Das Substrat H-D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide-dihydrochloride (S2266) lieferte die Firma Kabi AB, Mölndal, Schweden und das Substrat Fulylacryloyl-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG) zum Nachweis des Angiotensin-converting Enzyme die Firma Calbiochem, La Jolla, U.S.A.. Sojabohnen-Trypsininhibitor und Limabohnen-Trypsininhibitor stammten von der Firma Sigma, St. Louis, U.S.A.. Triton X-100, N,N'-Methylenbisacrylamid, Acrylamid, Dodecylsulfat-Na Salz (SDS), Glycin und N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED) wurden von der Firma Serva, Heidelberg bezogen.

Ammoniumformiat und Bovines Albumin lieferte die Fa. Sigma, St. Louis, U.S.A., DEAE-Sephacel die Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, NAD, Alkoholdehydrogenase (ADH) und die Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung (Combithek^R) die Fa. Boehringer, Mannheim. Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck AG, Darmstadt bezogen.

2.3. Isolierung von Ornithokallikrein aus dem Hühnerpankreas

Kallikrein wurde aus dem Pankreas nach einer modifizierten Methode von Werle und Hürter (115) extrahiert und weiterhin nach Hoffmann und Geiger isoliert (53).

Frisches Hühnerpankreas wurde von vorhandenem Fettgewebe freipräpariert, gewogen und homogenisiert. Dem Homogenat wurde die dreifache Menge 0,02 mol/l Essigsäure zugesetzt. Zu 200 ml dieses Gemisches wurden 5 ml einer Inhibitorlösung zugefügt. Diese Inhibitorlösung enthielt 0,125 g Sojabohnentrypsininhibitor, 0,125 g Limabohnentrypsininhibitor und 0,5 g Natriumazid. Die Inhibitoren sollten die Zerstörung des Kallikreins durch andere Pankreasproteasen verhindern. Nach fünfstündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde bei 4° C über Faltenfilter 12 Stunden lang filtriert. Das Filtrat wurde 24 Stunden gegen Aqua dest. und noch einmal 24 Stunden gegen 0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer pH 7,0 dialysiert. Die dialysierte Probe wurde 3 Stunden bei 4° C und 35000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand zur Ionenaustauschchromatographie auf eine DEAE-Sephacel Säule (10 x 1 cm), die mit 0,1 mol/l Ammoniumformiatpuffer aequilibriert worden war, aufgetragen. Mit diesem Puffer wurde so lange nachgewaschen, bis das Eluat proteinfrei war (Messung der Extinktion bei 280nm). Die Elution der Probe erfolgte über einen Natriumchlorid - Stufengradienten Die Elutionsge-

schwindigkeit betrug 7,5 ml/Stunde. Fraktionen von jeweils 2,5 ml wurden gesammelt. Die nach jedem Gradienten erhaltenen Fraktionen mit dem größten Proteingehalt (Messung bei 280 nm) wurden vereint und auf Proteasenaktivität photometrisch untersucht.

2.4. Messung der Proteasenaktivität der Pankreasfraktionen

Die Messung der Proteasenaktivität wurde nach der Methode von Geiger und Fritz (41) durchgeführt. Als Substrat diente der Ethylester AcPheArgOEt, der von Kallikrein hydrolysiert wird. Der dabei freigesetzte Alkohol wird mit Hilfe von NAD und Alkoholdehydrogenase (ADH) quantitativ nachgewiesen. Dabei ist eine Enzymeinheit als diejenige Enzymmenge definiert, die 1 Mikromol Äthanol pro Minute bei 37° C freisetzt.

Reagentien im Test:

Puffer : 30,4 g $\text{Na}_4 \text{P}_2 \text{O}_7 \times 10 \text{H}_2 \text{O}$
8,2 g Semicarbazidhydrochlorid
1,8 g Glycin
20-24 ml 2N NaOH zum Einstellen des pH-
wertes auf 8,7
ad 1000 ml Aqua bidest.

NAD : 204 mg NAD in 10ml Wasser
ADH : 100 mg ADH in 3,4 ml Wasser
AcPheArgOEt : 7,65 mg in 1 ml Wasser

Testverlauf:

0,1 ml Enzymlösung , 0,05 ml NAD, 0,38 ml Aqua dest. und 0,01 ml ADH wurden zu 1 ml Pufferlösung gegeben. Diese Mischung wurde 5 Minuten lang auf 37° C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,05 ml AcPheArgOEt gestartet. Die Extinktionszunahme wurde bei 366 nm mit dem

Photometer gemessen und ihr zeitlicher Verlauf mit dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Der Berechnung der Enzymaktivität wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $3300 \text{ mol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ für das gebildete NADH zugrundegelegt.

Zur Hemmung der Proteasenaktivität wurde dem Reaktionsansatz 5 mg/ml Sojabohnentrypsininhibitor zugesetzt. Mit dieser Lösung wurde die Probe vor der Messung 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kallikreinaktivität ist der Anteil der Protease, der durch den Sojabohnentrypsininhibitor (SBTI) nicht gehemmt wird.

In einem weiteren Versuch wurde eine Pankreasprobe, die wie oben beschrieben wurde, extrahiert worden war, ebenfalls einer DEAE-Sephacel Ionenaustauschchromatographie unterzogen. Im Gegensatz zum ersten Experiment erfolgte aber die Elution über einen linearen Gradienten von 0,01 - 0,5 mol/l NaCl im Formiatpuffer. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 8 ml/Stunde. Es wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt und die Kallikreinaktivität der einzelnen Fraktionen photometrisch bestimmt (s.o.).

2.5. SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE) nach Lämmli (58)

Zur Reinheitsüberprüfung der Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie und zur Molekulargewichtsbestimmung des Ornithokallikreins wurde die horizontale SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese in ultradünnen Gelen durchgeführt (45). Dabei werden die Proteine unter Gleichschaltung der Nettoladungsdifferenzen in alleiniger Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht getrennt. Durch die Umhüllung der Proteinmoleküle mit einem stark negativen SDS-Mantel werden intermolekulare Ladungs-

unterschiede überlagert. Während der elektrophoretischen Trennung kommen somit nur noch die durch unterschiedliche Molekülgröße entstehenden Reibungswiderstände in Polyacrylamidgelen mit definierter Porengröße zum Tragen, woraus eine Trennung der Moleküle nach unterschiedlichen Molekulargewichten resultiert. Durch Färben der Gele werden die Proteinbanden sichtbar gemacht und mit Hilfe von Standardproteinlösungen das Molekulargewicht der Proteine bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit 15% Polyacrylamidkonzentration verwendet.
Folgende Lösungen und Puffer wurden benützt:

Acrylamidlösung (30%):

29,2 g Acrylamid
0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid
ad 100 ml Aqua bidest.

Gelpuffer pH 8,8:

1,5 mol/l Tris (=18,17 g / 100 ml)
0,4% SDS

Probenpuffer pH 8,8:

1% SDS in 10 ml Gelpuffer
ad 100 ml Aqua bidest.

Elektrodenpuffer:

Stammlösung:

30,28 g Tris
144,0 g Glycin
10,0 g SDS
10 mg Natriumazid
ad 1000 ml Aqua bidest.

Kathoden/Anoden-Elektrodenpuffer:

(0,375 mol/l Tris/Glycin, pH = 8,3)

200 ml Stammlösung ad 2000 ml Aqua bidest.

Davon je 1000 ml in die beiden Puffertanks.

Färbelösung:

450 ml Äthanol 96%

100 ml Eisessig

450 ml Aqua bidest.

5 g Coomassie Brilliant Blue

Entfärbelösung:

250 ml Äthanol 96%

100 ml Eisessig

450 ml Aqua bidest.

Fixierlösung:

200 g Trichloressigsäure ad 1000 ml Aqua bidest.

Imprägnierlösung:

700 ml Methanol

30 ml Glycerin (100%)

ad 1000 ml Aqua bidest.

Polymerisierungsvermittler:

10% Ammoniumperoxodisulfat (Per)

N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

Es wurden 500 µm dicke Gele hergestellt. Diese wurden zwischen zwei Glasplatten auf Plastikfolien (GelBond PAG Film 1850-211, 125 mm x 260 mm, Fa. LKB, Bromma, Schweden) polymerisiert (46).

Zusammensetzung des Gels:

15 ml Acrylamidlösung (30%)
7,5 ml Aqua bidest.
7,5 ml Gelpuffer pH 8,8
0,1 ml Per (10% Ammoniumperoxodisulfat)
0,015 ml TEMED

Die horizontale Elektrophorese wurde in einer Multiphor II-Elektrophoresekammer der Fa. LKB durchgeführt.

Die Verwendung eines Slotformers aus Kunststoff (Fa. Serva, Heidelberg) erlaubte ein Auftragen von maximal 23 Proben zu 6 µl pro Gel an der Kathodenseite.

Die Proben wurden mit Probenpuffer 1:2 verdünnt; den Markerproteinen wurde 0,01% Bromphenolblau zur Markierung der Lauffront zugegeben. Die Elektrophorese verlief bei 5° C (Kühlplatte), 600 V Spannung, 50 mA Stromstärke und 30 Watt Leistung.

Sobald die Bromphenolblau-Bande die anodische Elektrodenbrücke erreicht hatte, wurde der Lauf nach zusätzlichen 15 Minuten beendet (Gesamtdauer etwa 90 Minuten). Die Gele wurden für 20 Minuten in Fixierlösung eingelegt, danach etwa 60 Minuten gefärbt und mit Entfärbelösung solange entfärbt, bis der Hintergrund möglichst farblos war. Zum Trocknen wurden die entfärbten Gele für 1 Minute in Imprägnierlösung getaucht und anschließend mit einer Zellophanfolie bedeckt. Nach dem vollständigen Trocknen wurde die Zellophanfolie mit dem Polyacrylamidgel vom GelBond PAG Film abgezogen und ausgewertet.

Molekulargewichtsbestimmung der Proteine nach Weber und Osborn (113):

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde zu jedem Gel mit Hilfe der Markerproteine eine Eichgerade aufgestellt.

Folgende Markerproteine wurden verwendet:

Phosphorylase b	97 400 d
Glutamat Dehydrogenase	55 400 d
Lactat Dehydrogenase	36 500 d
Sojabohnen Trypsininhibitor	20 100 d

Zur Erstellung der Eichgeraden wurden die Wanderungsstrecken der einzelnen Banden ab der Auftragsstelle gemessen. Auf halblogarithmischem Papier wurden die Molekulargewichte der Eichproteine (Ordinate) gegen die gemessenen Wanderungsstrecken (Abszisse) aufgetragen. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnte, bei bekannter Wanderungsstrecke der Probe, das entsprechende Molekulargewicht bestimmt werden.

2.6. Blutdruckmessung am erwachsenen Huhn

Im weiteren Verlauf sollten die Pankreasproben auf ihre biologische Kallikreinaktivität (Blutdrucksenkung) untersucht werden. Für diese Versuche wurden Hühner von 1 - 1,5 kg Körpergewicht verwendet.

Die Narkose erfolgte mit 0,5 ml Hexobarbital (Evipan^R) 0,1 g/ml NaCl intravenös in die Vena ulnaris. Die Anordnung des Versuchsystems entsprach modifiziert der Darstellung bei Werle (114). An dem auf der Seite liegenden Tier wurden die große Beinarterie und -vene in der Höhe der Kniekehle freigelegt und nach proximal freipräpariert. Über einen Venenverweilkatheter in der Vena iliaca externa wurden die zu untersuchenden Substanzen appliziert. Ferner konnte durch langsames Infundieren von physiologischer Kochsalzlösung ein Thrombosieren des Blutes im Katheter verhindert werden. Die Meßkanüle wurde in der Arteria ischiadica externa angebracht. Sie war über einen PVC-Schlauch mit einem elektromechanischen Wandlerelement

verbunden. Die Druckänderungen in der Arterie wurden über den PVC-Schlauch weitergeleitet und generierten elektrische Spannungen, die durch einen Verstärker verstärkt wurden und mit einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet werden konnten.

Durch dieses System konnten arterielle Druckschwankungen registriert werden, die durch die intravenöse Verabreichung von Testsubstanzen hervorgerufen wurden. Da kein geeichtes Gerät zur Verfügung stand, wurde die relative Änderung des Blutdrucks angegeben.

Mit dieser Methode wurden folgende Substanzen auf ihre blutdruckwirksamen Eigenschaften untersucht:

Pankreasrohextrakte, Acetonfällungen dieser Extrakte, Pankreasfraktionen nach Ionenaustauschchromatographie und Angiotensin I.

Nach der Beschreibung des Kallikreins im Hühnerpankreas sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit die pulmonale Kallikrein- und Angiotensin-converting Enzyme Aktivität bei Hühnerfeten um den Zeitpunkt des Schlupfes untersucht werden. Dabei wurden Versuchsgruppen mit verschiedenen Substanzen behandelt und unbehandelten Kontrolltieren gegenübergestellt.

2.7. Applikation der Substanzen

Die Applikation der eingesetzten Substanzen erfolgte am 17. Inkubationstag mit einer 1 ml - Injektionsspritze über ein kleines Loch in der Eischale in die Luftkammer. Nach der Applikation wurde das Loch in der Eischale mit Klebstoff (Uhu^R) verschlossen.

Um eine schnelle Resorption der Substanzen durch die darunter verlaufenden Chorioallantoisgefäße zu gewährleisten, wurden die Eier für 3 Stunden auf die Spitze gestellt. Dieses Verfahren hat sich schon in früheren Versuchen als erfolgreich erwiesen (120,121,122). Auf diese Weise wurden folgende Substanzen verabreicht:

L - Thyroxin : 18,9 μ mol pro Ei
Thioharnstoff : 32,8 μ mol pro Ei
Dexamethason : 0,25 μ mol pro Ei
(Voren^R)

Um den Gasaustausch über die Luftkammer zu verhindern und um dadurch eine künstliche Hypoxie in der Luftkammer zu erzeugen, wurde der Bereich der Eischale über der Luftkammer nach einer Methode von Wittmann und Weißenbeck (123) mit Holzleim (Ponal^R) abgedeckt.

Dieses Verfahren hatte weniger Nebenwirkungen gezeigt, als die Verwendung von Paraffin nach Visschedijk (106,107,108).

2.8. Bestimmung der Kallikreinaktivität in der Lunge

Die Embryonen wurden am entsprechenden Untersuchungstag von der Eischale befreit und durch Dekapitieren getötet. Sofort danach wurden die Lungen entnommen, vom umgebenden Bindegewebe befreit und gewogen. Die Lungen wurden daraufhin mit der dreifachen Menge 0,2 mol/l Trispuffer (pH 8,2) versetzt, homogenisiert, und nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 25000 x g wurde die Aktivität im Überstand bestimmt. Als Substrat wurde H-D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide-dihydrochloride (S2266) verwendet (23,37, 41,53). Das Enzym spaltet vom Substratmolekül die Paranitrogruppe hydrolytisch ab, welche eine Extinktionszunahme bei 405 nm bewirkt.

Beim Test wurde in folgender Weise vorgegangen:

0,05 ml Probe wurden zu 0,75 ml 0,2 mol/l Trispuffer pH 8,2 gegeben. Davon wurden 0,6 ml in eine Halbmikroküvette pipettiert und auf 37° C temperiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml 1,5 mmol/l S 2266 gestartet. Die Extinktionszunahme wurde mit dem Photometer gemessen und mit dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet.

Um unspezifische Extinktionsveränderungen zu berücksichtigen, wurde gleichzeitig ein Blindwert, bestehend aus dem Reaktionsansatz ohne Substratlösung, gemessen. Der Berechnung der Volumenaktivität (U/l) wurde ein Extinktionskoeffizient von $9800 \text{ mol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ (37) zugrunde gelegt.

Die Umwandlung von 1 Mikromol Substrat pro Minute bei 37°C entspricht einer Einheit (U) der Enzymaktivität.

2.9. Bestimmung der Kallikreinaktivität im Plasma und Vollblut

Da Kallikrein im Säugerblut enthalten ist, und sich der Blutgehalt der Lunge mit dem Beginn der Atmung verändert, sollte festgestellt werden, ob auch Hühnerblut eine nennenswerte Kallikreinaktivität enthält. Zu diesem Zweck wurde einmal Plasma und zum anderen Vollblut untersucht. Das Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen und die Blutgerinnung durch Heparin, Citrat oder durch Zugabe von EDTA gehemmt.

Bei der Untersuchung des Plasmas, das aus Vollblut durch zehnminütiges Zentrifugieren bei $2000 \times g$ gewonnen wurde, trat eine Trübung im Testansatz auf, die aber durch Zugabe von 1% Triton X-100 verhindert werden konnte.

In Vorversuchen mit Lungenproben hatte sich herausgestellt, daß 1% Triton keine Hemmung der Kallikreinaktivität hervorruft.

Mit der oben beschriebenen Methode konnte weder im Vollblut noch im Plasma Kallikreinaktivität festgestellt werden, auch wenn unterschiedliche Gerinnungshemmer (s.o.) verwendet worden waren. Auch nach Zugabe von 1% Triton X-100 zur Haemolyse des Blutes trat keine Aktivität auf. Eine Verfälschung der gemessenen Enzymaktivität in der

Lunge durch vorhandenes Blut ist somit nicht zu befürchten.

2.10. Hemmung der Proteasenaktivität

Um die Hemmbarkeit des Kallikreins durch spezifische Inhibitoren zu testen, wurde die Probe vor der Messung 5 Minuten lang mit 5 mg/ml Sojabohnentrypsininhibitor (35) bzw. 30 Minuten lang mit 10^{-5} mol/l Aprotinin (39) bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 0,1 ml S 2266 zum Testansatz gestartet und mit der oben beschriebenen Methode gemessen.

2.11. Bestimmung der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität in der Lunge

Die Enzymaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von Holmquist et al. (55) bestimmt.

Dieser Test beruht auf der hydrolytischen Spaltung des synthetischen Substrats Furylacryloyl-L-phenylalanylglycyl-glycine (FAPGG). Durch hydrolytische Abspaltung des Glycyl-glycin-Restes kommt es zur Abnahme der Eigenextinktion des Substrates bei 334 nm.

Die Konzentration und die eingesetzte Probenmenge wurden so gewählt, daß ein linearer Verlauf der hydrolytischen Spaltung über mehr als 30 Minuten erreicht werden konnte.

Ansatz:

1 ml 5×10^{-4} mol/l FAPGG gelöst in 0,05 mol/l Trispuffer pH 7,5 mit 0,3 mol/l NaCl werden in eine Halbmikroküvette pipettiert und auf 37°C temperiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 0,05 ml Probe gestartet.

Der Reaktionsverlauf wurde photometrisch gemessen und mit dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet .

Der Berechnung der Volumenaktivität und der spezifischen Aktivität wurde ein Extinktionskoeffizient von $6400 \text{ mol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$, der in Vorversuchen mit Hilfe einer Referenzlösung ermittelt wurde, zugrundegelegt.

Vorversuche zeigten, daß die Angiotensin-converting Enzyme Aktivität nicht im Überstand, sondern im Niederschlag, der durch Zentrifugation des Lungenhomogenats bei $25000 \times g$ entstanden ist (s.o.), enthalten ist. Das Enzym wurde aus dem Niederschlag in folgender Weise in Lösung gebracht:

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit der fünffachen Menge (bezogen auf das Ausgangsgewicht der Lunge) $0,05 \text{ mol/l}$ Trispuffer pH 7,5 resuspendiert und nochmals homogenisiert. Der Pufferlösung waren ferner $0,3 \text{ mol/l}$ NaCl zugesetzt, da das Angiotensin-converting Enzyme bei dieser Kochsalzkonzentration optimale Aktivität zeigt (15,16,55). Zum Ablösen des Enzyms von den Endothelienmembranen enthielt der Puffer außerdem 1% Triton X-100. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von Triton X-100 gegenüber anderen Methoden, wie Ultraschallbehandlung oder Verwendung von Tween, eine höhere Enzymaktivität zur Folge hatte. Zur Enzymablösung wurde das suspendierte Homogenat in Eppendorf-Reagiergefäße übergeführt und auf einem Eppendorf-Rotationschüttler 30 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt. Längeres Schütteln führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Enzymaktivität. Anschließend wurden die nicht gelösten Bestandteile des Homogenats durch nochmaliges 20-minütiges Zentrifugieren bei $25000 \times g$ abzentrifugiert.

2.12. Bestimmung der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität im Plasma und Vollblut

Ähnlich wie beim Kallikrein wurden auch beim Angiotensin-converting Enzyme Plasma- und Vollblutproben hinsichtlich ihrer Enzymaktivität getestet.

Auch hier konnte in den Proben keine Aktivität festgestellt werden.

2.13. Hemmung des Angiotensin-converting Enzyme

Die Abhängigkeit der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität von einer ausreichenden Kochsalzkonzentration ist von vielen Autoren beschrieben worden (15,16,55). Die Enzymhemmung wurde deshalb in einem Reaktionsansatz durchgeführt, der sich durch das Fehlen von Kochsalz in der Substratlösung auszeichnet.

Hemmung mit Captopril:

Mit der synthetischen Substanz Captopril steht ein spezifischer Inhibitor des Angiotensin-converting Enzyme zur Verfügung, der beim Menschen auch therapeutisch verwendet wird (2).

Zur näheren Charakterisierung sollte das Verhalten des Angiotensin-converting Enzyme aus der Lunge des Hühnerfetus gegenüber diesem Inhibitor getestet werden.

Dazu wurde die Lungenprobe (s.o.) mit 0,05 mol/l Captopril 5 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität mit der oben beschriebenen Methode gemessen.

2.14. Bestimmung des Hämoglobingehalts der Lunge

Die Bestimmung des Hämoglobingehalts im Lungenüberstand nach der ersten Zentrifugation (s.o.) sollte einen Hinweis auf das Ausmaß der Durchblutung der embryonalen Lungen geben.

Die Hämoglobinbestimmung wurde nach der Cyan-Hämiglobinmethode durchgeführt (5).

Die Hämoglobinreagenzlösung besteht aus:

Kaliumhexacyanoferrat	: 0,6 mmol/l
Kaliumcyanid	: 0,7 mmol/l
Kaliumdihydrogenphosphat	: 1,0 mol/l
Triton X-100	: 1 %

Zu 2,5 ml dieser Reagenzlösung wurde 0,1 ml Probe zugegeben. Die in der Probe vorhandenen Hämoglobinverbindungen werden durch Kaliumcyanid und Kaliumhexacyanoferrat in Hämiglobincyanid übergeführt. Die Farbintensität des gebildeten Hämiglobincyanids ist der Hämoglobinkonzentration proportional und wird bei 546 nm nach etwa 15 Minuten gemessen.

2.15. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Enzymproben wurde nach einer modifizierten Biuret-Methode (48) durchgeführt. Als Standard wurde bovines Serumalbumin verwendet.

2.16. Automatische Registrierung der fetalen Respiration

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität in der Lunge von der Dauer der Beatmung festzustellen, mußte der genaue Zeitpunkt des Einsetzens der Lungenatmung bestimmt werden. Hierzu wurde ein von Wittmann et al. (120) entwickeltes Meßsystem verwendet.

Am 18. Inkubationstag wurde am stumpfen Eipol eine Fläche von etwa $0,25 \text{ cm}^2$ mit Alkohol entfettet und an diese Stelle ein PVC-Schlauch ($d=2\text{mm}$) mit Cyanoacrykleber (Uhu-Sekundenkleber) befestigt.

Nach einer Stunde wurde durch den Schlauch ein Loch ($d = 1,4 \text{ mm}$) in die Eischale gebohrt.

Die bei Einsetzen der Lungenatmung auftretenden Druckänderungen in der Luftkammer wurden über den PVC-Schlauch zu einem elektromechanischen Wandlerelement, bestehend aus einer flexiblen Membran und einem piezoelektrischen Wandler (Piezoelement R 101, Gulton Industries, Inc., 212 Durham Avenue, Metuchen, New Jersey), übertragen.

Prinzip der Messung:

Schwankungen des Luftdrucks in der Luftkammer durch die Lungenatmung des Feten führen über die Membran zu einer Kraftwirkung auf das Wandlerelement, wodurch eine elektrische Spannung generiert wird, die über eine Meßleitung an einen Meßverstärker weitergegeben wird. Der Meßverstärker ist seinerseits mit einem Kompensationschreiber verbunden, welcher die Druckschwankungen sichtbar aufzeichnet.

8, 15 und 22 Stunden nach Einsetzen der Lungenatmung wurden die Feten getötet und die Lungen auf Kallikrein- und Angiotensin - converting Enzyme Aktivität untersucht (s.o.)

2.17. Statistische Auswertung

Die in den Tabellen angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar. Zusätzlich wird die Standardabweichung angegeben. Zum Vergleich zweier empirischer Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten wurde der Student's t-Test durchgeführt (86). Die Anzahl der Proben wird in den Abbildungen in Klammern angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung des Ornithokallikreins und des Angiotensin-converting Enzyme

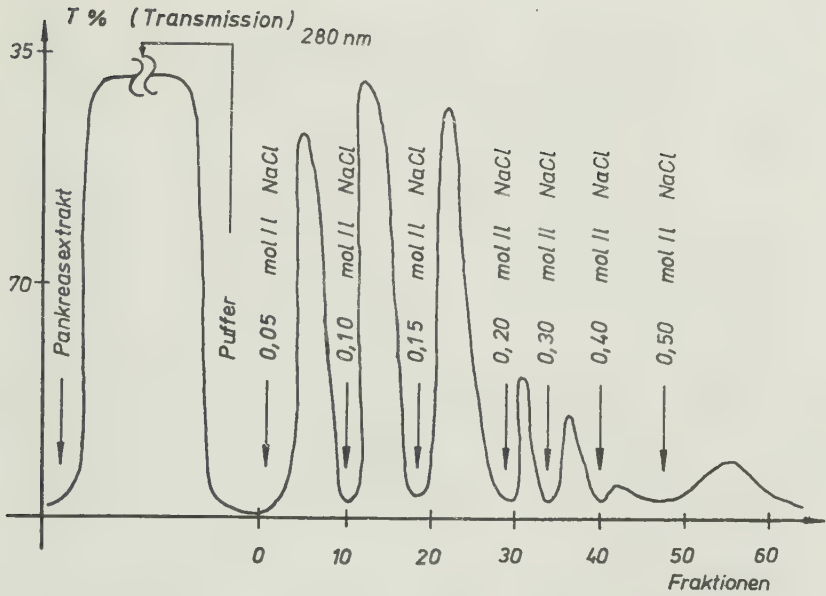
Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Ornithokallikrein näher charakterisiert. Als Untersuchungsmaterial diente das Pankreas, das für seinen besonders hohen Proteasengehalt bekannt ist.

Zu diesem Zweck wurden die Proteasen aus dem Pankreas extrahiert und anschließend mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie angereichert. Abb. 2a zeigt das Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie, das mit dem Stufengradienten erreicht wurde. Daraus wird ersichtlich, daß mit den verschiedenen NaCl-Konzentrationen sieben Proteinpeaks (gemessen bei 280 nm) erhalten wurden. Die Fraktionen unter den jeweiligen Peaks wurden vereint und hinsichtlich ihrer proteolytischen Aktivität und Hemmbarkeit untersucht.

Die Proben 1 - 5 zeigten proteolytische Aktivität. Diese konnte durch Aprotinin vollständig gehemmt werden. Wie aus Abb. 2a ersichtlich ist, war in Anwesenheit des Sojabohnentrypsininhibitors (SBTI) lediglich in der Probe 1 noch Proteasenaktivität vorhanden. Damit weist diese Probe Eigenschaften auf, die charakteristisch für Gewebekallikrein sind.

Zur genaueren Darstellung der Elution des Pankreaskallikreins wurde der Pankreasextrakt in einem weiteren Versuch mit einem linearen Gradienten von 0,01 - 0,50 mol/l NaCl fraktioniert.

Das entsprechende Elutionsprofil ist in Abb. 2b dargestellt. Kallikrein - gemessen an der Proteasenaktivität,



Proben-Nr.:	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
	mU/mg Protein			mU/mg Protein			
	□			▽			
①	140,40			79,00			
②	794,00			0,00			
③	108,00			0,00			
④	978,00			0,00			
⑤	238,00			0,00			
⑥	0,00			0,00			
⑦	0,00			0,00			

Abb. 2a: Anreicherung des Ornithokallikreins aus dem Pankreas mit Hilfe der Ionenaustausch-chromatographie (Stufengradient)

□ = Proteasenaktivität ungehemmt

▽ = Proteasenaktivität SBTI gehemmt

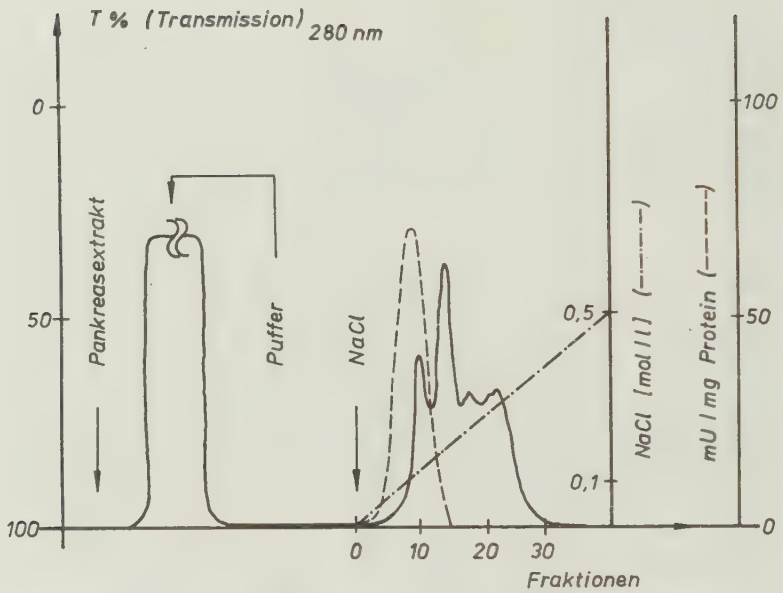


Abb. 2b: Anreicherung des Ornithokallikreins aus dem Pankreas mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie (linearer Gradient)

die nach Hemmung mit dem Sojabohnentrypsininhistor noch vorhanden ist - wurde zwischen einer Konzentration von 0,04 und 0,14 mol/l NaCl eluiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden daraufhin einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen (s.o.).

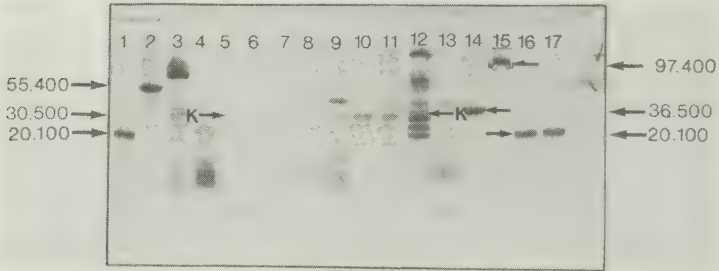
Wie Abb. 3 zeigt, waren in allen Fraktionen mehrere Proteinbanden vorhanden. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 30500 war dabei in allen kallikreinhaltigen Fraktionen sichtbar. Es fehlte aber im Durchlauf, sowie in den übrigen Fraktionen.

Zur biologischen Charakterisierung des Ornithokallikreins wurden die Proben auf ihre blutdrucksenkenden Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4a-c dargestellt.

Danach zeigte der rohe Extrakt aus dem Pankreas - intravenös verabreicht - eine deutliche Senkung des arteriellen Blutdrucks beim erwachsenen Huhn. Diese Senkung war nach kurzer Zeit wieder reversibel (Abb. 4a). Einen ähnlichen Effekt zeigten auch die Proben 1-5 aus der Ionenaustauschchromatographie mit dem Stufengradienten (s.o.). In der Abb. 4b ist die blutdrucksenkende Wirkung der Proben 1-2 beispielhaft dargestellt. Auch der Niederschlag des Pankreashomogenates, der mit 85 % Aceton erhalten wurde, bewirkte eine deutliche Blutdrucksenkung, die jedoch nach 30-minütiger Inkubation der Probe bei 90° C verschwand (Abb. 4c).

Nachdem sich gezeigt hatte, daß im Pankreas des Huhnes Ornithokallikrein vorhanden ist, interessierte nun, ob auch die Lunge eine Protease mit den Eigenschaften des Kallikreins besitzt. Es zeigte sich (Abb.5), daß auch in der Lunge eine Protease vorhanden ist, deren Aktivität mit Aprotinin fast vollständig gehemmt werden kann, während mit Sojabohnentrypsininhistor (SBTI) nur eine Hemmung von

Abb. 3: SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese der Pankreasfraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie mit dem linearen Gradienten (Abb. 2b)



- 1 = Sojabohnentrypsininhibitor (20100 d)
- 2 = Glutamat Dehydrogenase (55400 d)
- 3 = Pankreasextrakt (1:8 verdünnt)
- 4 = Durchlauf
- 5 = Fraktion 6
- 6 = Fraktion 7
- 7 = Fraktion 8
- 8 = Fraktion 9
- 9 = Fraktion 10
- 10 = Fraktion 11
- 11 = Fraktion 12
- 12 = Pankreasextrakt
- 13 = Fraktion 20
- 14 = Laktat Dehydrogenase (36500 d)
- 15 = Phosphorylase b (97400 d)
- 16 = Sojabohnentrypsininhibitor (20100 d)
- 17 = Sojabohnentrypsininhibitor (20100 d)
- K = Kallikrein

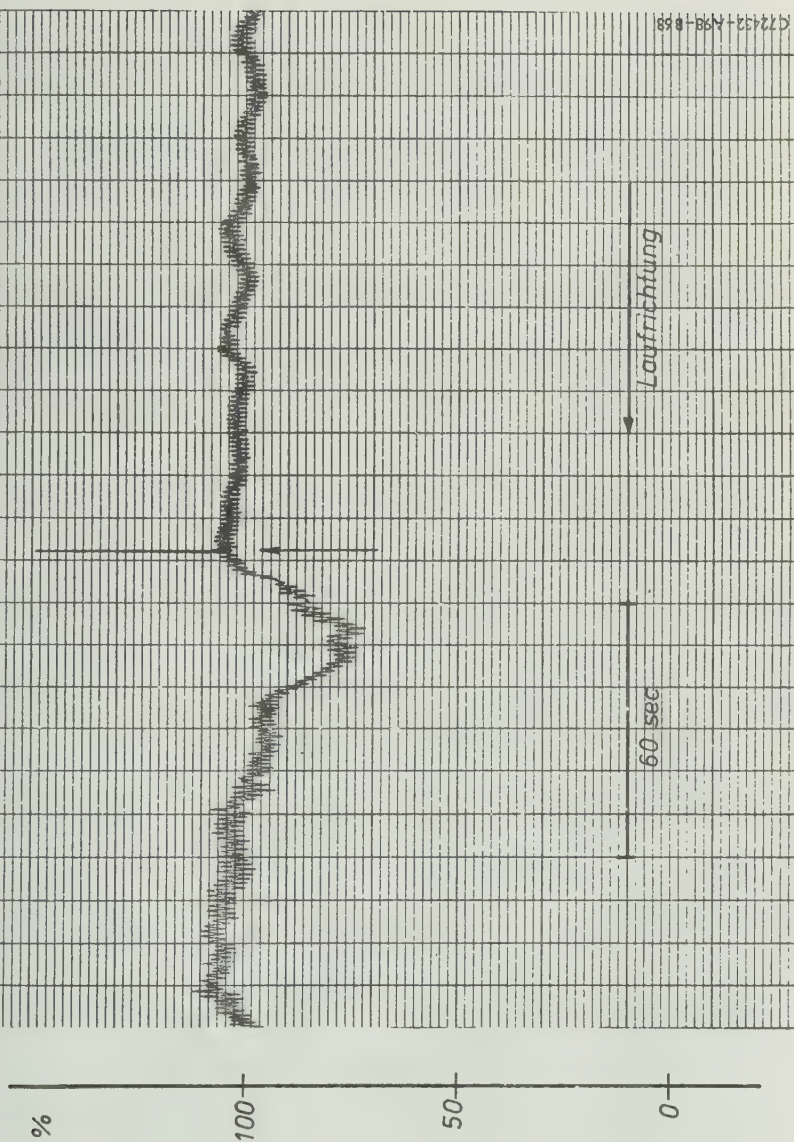


Abb. 4a: Einfluß des Pankreasextraktes auf den Blutdruck des Hühnes

↑ = 0,1 ml Pankreasextrakt

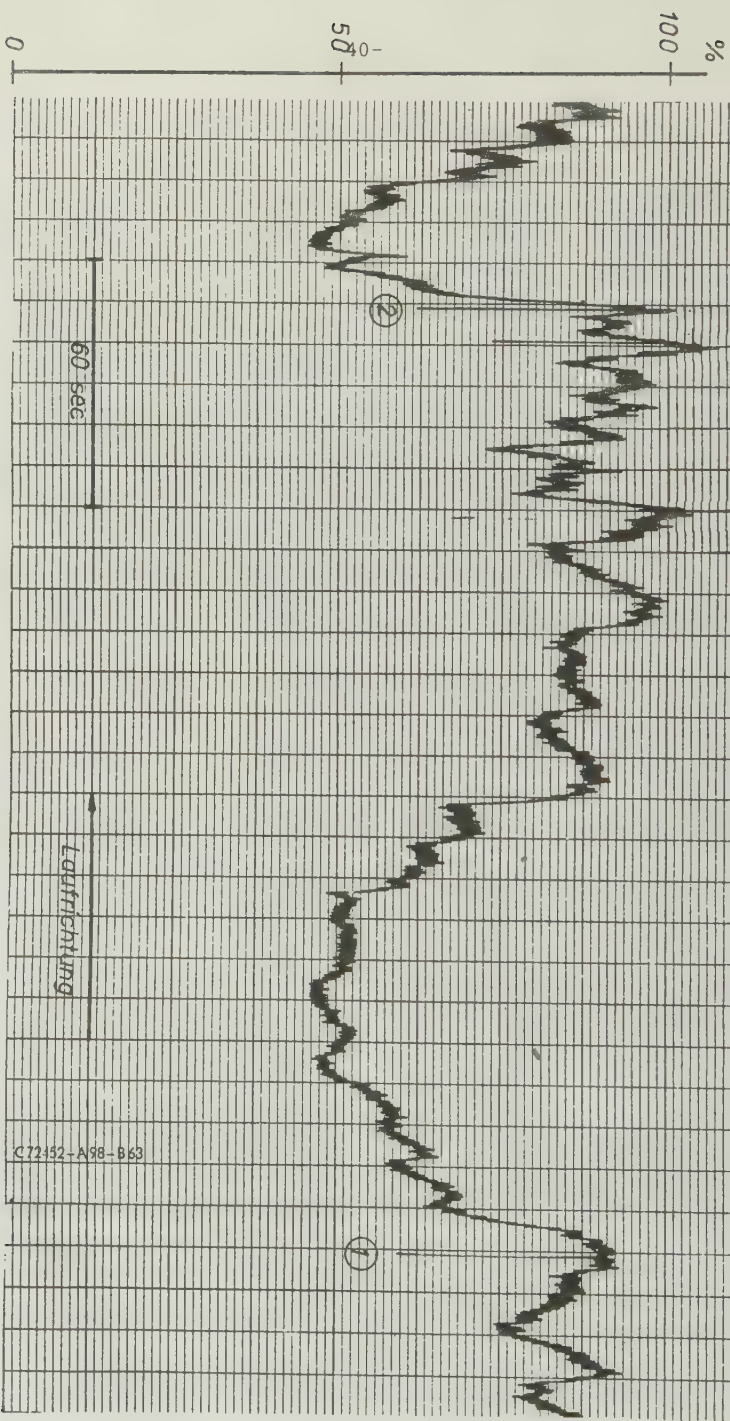


Abb. 4b: Einfluß der Pankreasfraktionen auf den Blutdruck des Huhnes

① = 0,2 ml Probe ①

② = 0,2 ml Probe ②

C72452-A98-B63

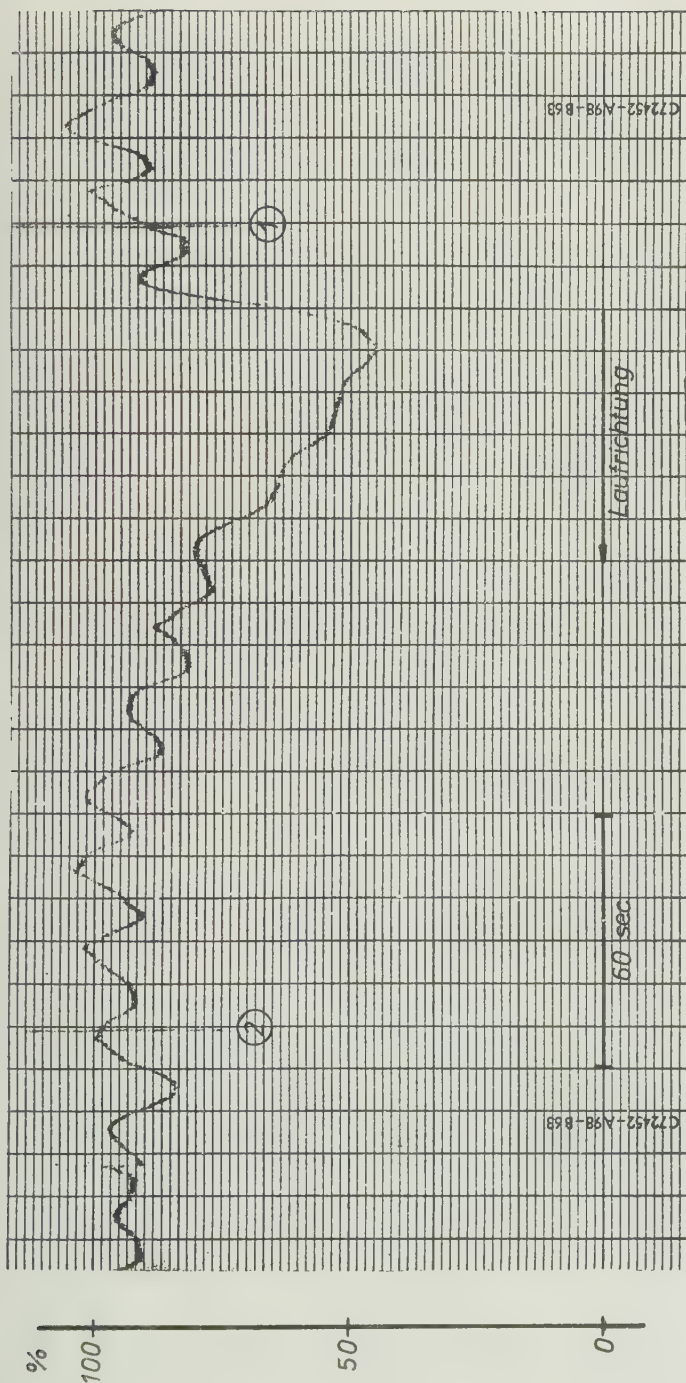


Abb. 4c: Einfluß der mit Aceton gefüllten Pankreasprobe auf den Blutdruck des Huhnes
 ① = 0,1 ml der gefüllten Probe
 ② = Probe ① nach 30 min Erhitzen bei 90°C

26% möglich ist. Offensichtlich ist die in der Lunge vorhandene Proteasenaktivität überwiegend durch das Kallikrein bedingt. Somit ist eine einfache Möglichkeit gegeben, das Kallikrein im Lungenhomogenat photometrisch zu bestimmen.

Abschließend wurde auch noch das Aktivitätsverhalten des Angiotensin-converting Enzyme untersucht, das zusammen mit der Aktivität des Kallikreins den Kininspiegel reguliert. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Aktivitätsmessungen zeigen die für Angiotensin-converting Enzyme typischen Eigenschaften, nämlich vollständige Hemmung mit Captopril und außerdem eine nur noch gering ausgebildete Aktivität in Abwesenheit von Natriumchlorid (Abb.6).

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob auch das aviäre Angiotensin-converting Enzyme, ähnlich wie das der Säuger, einen Einfluß auf den Blutdruck ausübt. Zu diesem Zweck wurde Angiotensin I intravenös verabreicht, das über das Angiotensin-converting Enzyme in der Lunge in Angiotensin II übergeführt wird. Letzteres erhöht beim Säuger bekanntlich den Blutdruck. Wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, ist dies auch beim Vogel der Fall.

3.2. Spezielle Untersuchung der pulmonalen Proteasenaktivität des Hühnerfetetus.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Aktivitätsverlauf vom Kallikrein und Angiotensin-converting Enzyme in der Endphase der Fetogenese untersucht. Dabei interessierte, inwieweit durch Eingriffe in die Entwicklung Auswirkungen auf die Aktivität dieser Enzyme zu erwarten sind. Die Untersuchung der Feten erfolgte vom 17. bis zum 21. Bebrütungstag.

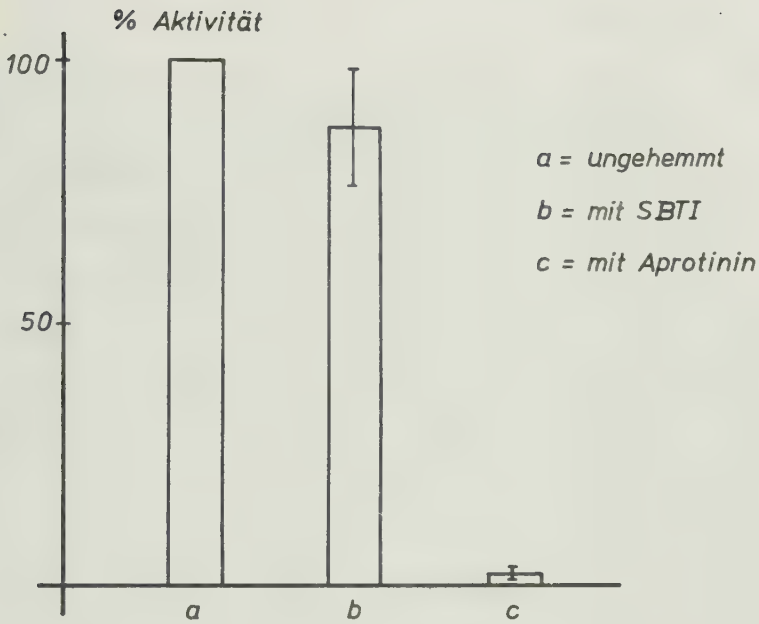


Abb. 5: Einfluß von Aprotinin und Sojabohentrypsininhibitor (SBTI) auf die Aktivität des pulmonalen Ornithokallikreins

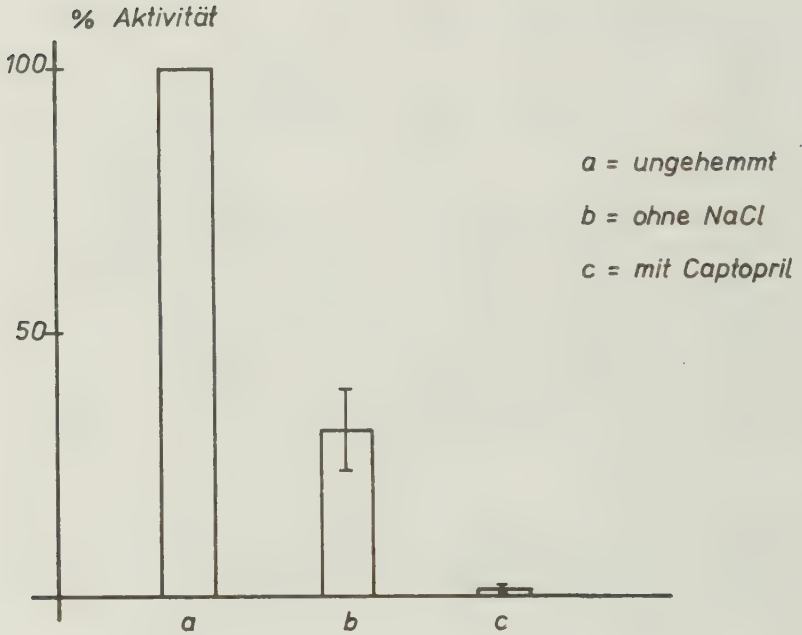


Abb. 6: Einfluß von Captopril und NaCl auf die Aktivität des aviären Angiotensin-converting Enzyme's

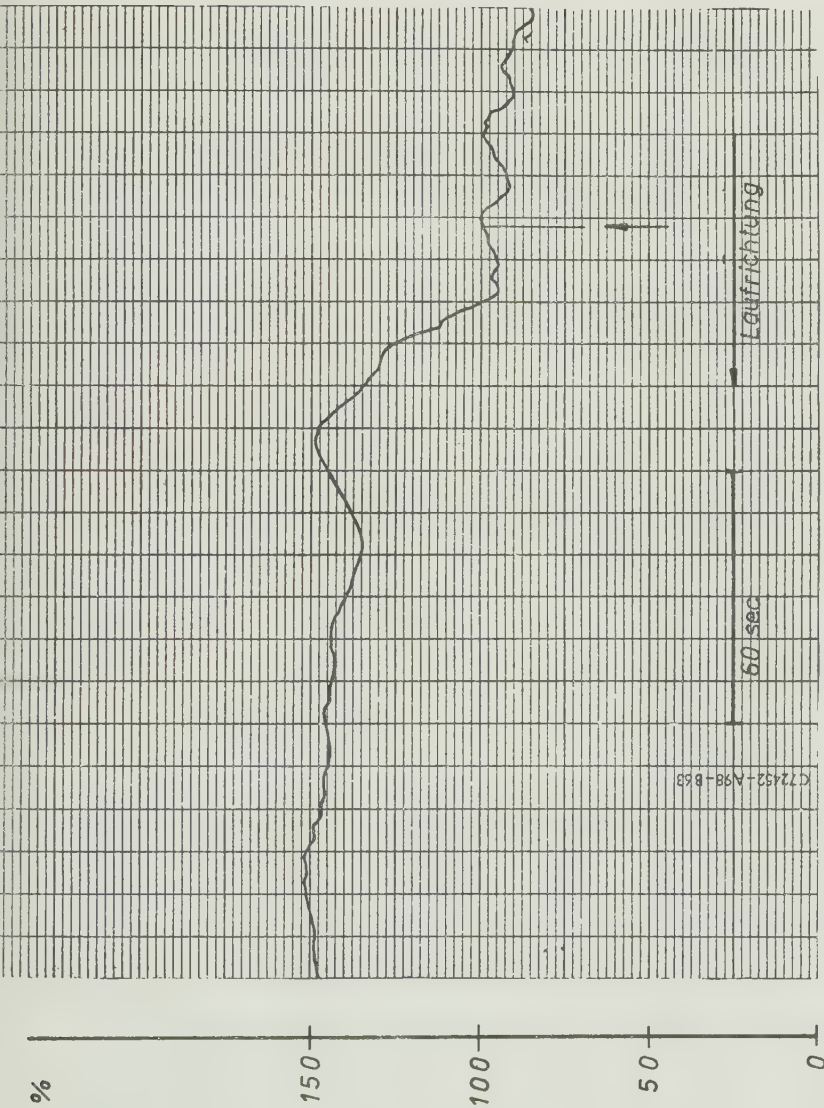


Abb. 7: Einfluß von Angiotensin I auf den Blutdruck des Huhnes

3.2.1. Einteilung der verschiedenen Untersuchungsstadien

Für diese Untersuchungen war der Status der Entwicklung von Interesse.

Deswegen wurde mit Hilfe der Schwimmprobe ermittelt, ob die Lungen bereits beatmet waren.

Außerdem wurde registriert, ob die Feten mit ihrem Schnabel in der Luftkammer waren, bzw. ob die Eischale bereits angepickt war.

Kontrolltiere:

Die Feten der unbehandelten Gruppe befanden sich bis einschließlich 19. Inkubationstag noch nicht mit ihrem Schnabel in der Luftkammer; außerdem sank die Lunge bei der Lungenschwimmprobe. Am 20. Inkubationstag konnten Tiere unterschieden werden, die sich entweder in der Luftkammer befanden oder schon angepickt hatten. Am 21. Inkubationstag wurden nur Tiere untersucht, die schon geschlüpft waren. Bei diesen Tieren fiel die Schwimmprobe positiv aus.

Behandelte Tiere:

Die mit Dexamethason behandelten Feten sowie Feten, deren Luftkammer mit Holzleim abgedeckt worden war, zeigten gegenüber der Kontrollgruppe hinsichtlich dieser Entwicklungskriterien keine Unterschiede.

Aus der Gruppe der mit Thioharnstoff behandelten Tiere wurden ausschließlich Feten untersucht, deren Lungen selbst am 21. Inkubationstag nicht beatmet waren. Diese Tiere, die sich weder in der Luftkammer befanden noch angepickt hatten, waren auch deutlich schwächer entwickelt als die Kontrollen. Feten, deren Lungen am 20. Tag schon

beatmet waren, unterschieden sich auch äußerlich nicht von den Embryonen der Kontrollgruppe. Bei ihnen wurde angenommen, daß der Thioharnstoff keine Wirkung gezeigt hatte. Die Lungen dieser Tiere wurden deshalb nicht untersucht.

Die L-thyroxinbehandelten Feten erschienen schon am 18. Inkubationstag gegenüber der Kontrollgruppe weiter entwickelt: Sie waren größer und der Dottersack war zum Teil schon eingezogen. Der Großteil der Tiere dieser Gruppe war aber am 19. Inkubationstag in die Luftkammer eingedrungen oder hatte sogar schon angepickt. Ihre Lungen waren beatmet (positive Schwimmprobe). Die untersuchten Tiere der L-Thyroxingruppe waren am 20. Inkubationstag bereits geschlüpft.

3.2.2. Verlauf der pulmonalen Kallikreinaktivität beim Hühnerfetus

Kallikreinaktivität bei Kontrolltieren:

Die spezifische Kallikreinaktivität in den Lungenproben von Kontrolltieren (Tab.1) betrug am 17. Inkubationstag durchschnittlich 84,71 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein. Die Aktivität stieg dann langsam bis zum 18. Inkubationstag auf 158,77 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein und am 19. Inkubationstag auf 234,83 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein an. Die spezifische Aktivität in Lungenproben von Tieren, die noch nicht angepickt hatten, deren Schnabel sich aber am 20.Tag in der Luftkammer befand, betrug 515,45 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein. Sie erhöhte sich am selben Tag noch auf 572,06 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein, sobald die Tiere angepickt hatten, was aber keiner signifikanten Zunahme entspricht. Ein weiterer Anstieg auf 774,25 $\mu\text{U}/\text{mg}$ Protein konnte beobachtet werden, wenn die Küken am 21. Inkubationstag

geschlüpft waren. Während die tägliche Aktivitätszunahme vom 17. zum 18. und dann zum 19. Inkubationstag nicht signifikant war ($p > 0,05$), waren die Zunahmen vom 19. zum 20. und vom 20. zum 21. Inkubationstag, ab dem Zeitpunkt des Respirationsbeginns signifikant ($p < 0,05$).

Kallikreinaktivität bei behandelten Tieren:

Die pulmonale Kallikreinaktivität der mit Dexamethason oder Holzleim behandelten Hühnerfeten verhielt sich ähnlich der der Kontrollgruppe (Tab. 1). Lediglich am 19. Inkubationstag wiesen die Kontrolltiere eine signifikant höhere Kallikreinaktivität in der Lunge auf als die mit Dexamethason behandelten Tiere ($p < 0,05$).

Vergleicht man die spezifischen Kallikreinaktivitäten der mit Thioharnstoff behandelten Feten mit der von gleichaltrigen Kontrollen (Abb. 8), so fällt auf, daß sie in den Lungenproben aller behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt war. Diese Erniedrigung war ab dem 20. Inkubationstag stets signifikant.

Die pulmonale Kallikreinaktivität der mit L-Thyroxin behandelten Embryonen war am 18. Inkubationstag ähnlich der von Kontrollen (Abb. 8). Hatte hingegen die Respiration am 19. Inkubationstag eingesetzt, so führte dies zu einer signifikanten Aktivitätszunahme gegenüber dem Vortag. Die Phase vom Anpicken der Eischale bis zum Schlupf hatte einen weiteren leichten Anstieg der Kallikreinaktivität zur Folge. Bemerkenswert ist außerdem, daß die pulmonale Kallikreinaktivität am 19. Tag bei Feten dieser Gruppe, die bereits geatmet hatten, signifikant höhere Werte aufwies als bei gleichaltrigen, nichtatmenden Kontrollen. Auch am 20. Inkubationstag war eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität geschlüpfter Küken gegenüber

Tabelle 1:

Pulmonale Kallikreinaktivität nach Behandlung mit
Dexamethason bzw. nach Abdichten der Luftkammer

Tage der Bebrütung	Kontrollen	Luftkammer abgedichtet	Dexamethason
	$\mu\text{U}/\text{mg Protein}$		
17	84.71 $\pm$ 25.98 n = 6		
18	158.77 $\pm$ 59.88 n = 5	165.76 $\pm$ 38.99 n = 9	107.69 $\pm$ 44.95 n = 6
19	234.83 $\pm$ 82.09 n = 23	222.29 $\pm$ 73.74 n = 9	162.16 $\pm$ 65.72* n = 15
20 a	515.45 $\pm$ 95.23 ⁺⁺ n = 16	450.98 $\pm$ 128.58 ⁺⁺ n = 18	624.71 $\pm$ 214.05 ⁺⁺ n = 7
b	572.06 $\pm$ 196.34 ⁺⁺ n = 21	524.02 $\pm$ 199.23 ⁺⁺ n = 13	543.26 $\pm$ 156.46 ⁺⁺ n = 11
21	774.25 $\pm$ 347.56 ⁺ n = 9	730.39 $\pm$ 274.64 n = 6	775.88 $\pm$ 155.51 ⁺ n = 7

a = Schnabel in der Luftkammer; b = Eischale angepickt
n = Anzahl der untersuchten Tiere

* = $p < 0.01$ im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen
+ = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.001$ im Vergleich zum Vortag

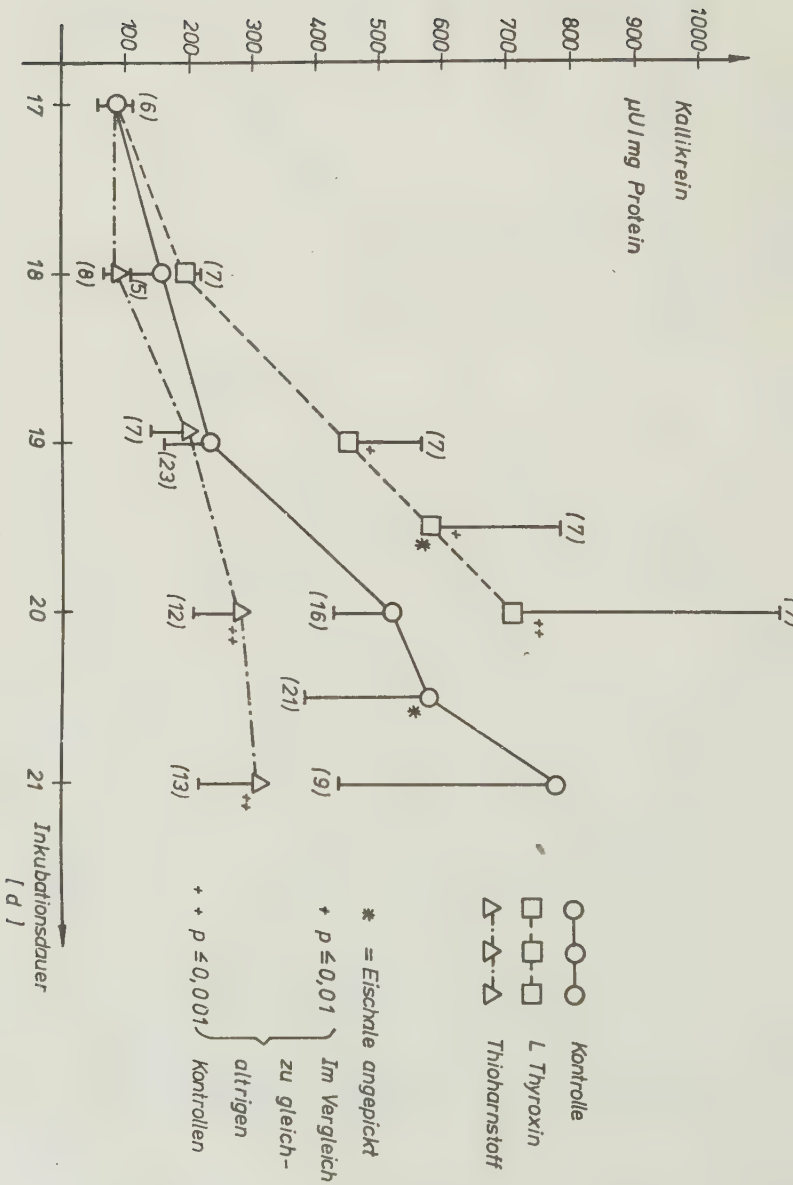


Abb. 8: Einfluss von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Verlauf der pulmonalen Kallikreinaktivität

Kontrolltieren, deren Schnabel sich lediglich in der Luftkammer befand, zu beobachten, während sie im Vergleich mit gleichaltrigen Kontrolltieren, die schon angepickt hatten, nur gering erhöht war.

Auffällig war bei allen untersuchten Gruppen, daß es zu keinem signifikanten Aktivitätszuwachs kam, solange die Lungen der Feten noch nicht beatmet waren. Erst mit Einsetzen der Atmung stieg die pulmonale Kallikreinaktivität deutlich an. Eine signifikante Aktivitätszunahme konnte lediglich bei den mit Thioharnstoff behandelten Tieren nicht festgestellt werden. Die Lungen der Feten dieser Gruppe waren allerdings auch nicht beatmet.

3.2.3. Verlauf der pulmonalen Hämoglobinkonzentration

In den folgenden Versuchen interessierte, inwieweit die eingesetzten Substanzen einen Einfluß auf die Lungendurchblutung genommen hatten. Als Maß für den Grad der Lungendurchblutung diente der Hämoglobingehalt im $25000 \times g$ Überstand der Lungenhomogenate.

Hämoglobingehalt bei Kontrolltieren:

Am 17. Inkubationstag betrug die Extinktion des Haemoglobintestes 0,062 (Tab. 2). Sie stieg am 18. Tag auf 0,075 und am 19. Inkubationstag auf 0,085 an. Die Zunahme vom 19. zum 20. Inkubationstag auf 0,120 bzw. 0,138 bei Embryonen, deren Schnabel in der Luftkammer war bzw. die schon angepickt hatten, war hochsignifikant ($p < 0,001$). Ein weiterer Extinktionszuwachs auf 0,153 war am 21. Tag bei geschlüpften Küken festzustellen.

Hämoglobingehalt bei behandelten Tieren:

Die Hämoglobinwerte der Lungenproben der mit Dexamethason behandelten Feten und von Tieren, deren Luftkammer mit Holzleim abgedeckt worden war, entsprachen im wesentlichen den Kontrollwerten (Tab. 2). Lediglich in den Lungenproben der Dexamethasongruppe konnten am 19. Inkubationstag und am 20. Tag bei angepickten Eiern deutlich niedrigere Extinktionswerte als bei gleichaltrigen Kontrollen festgestellt werden.

Die Extinktionen der Lungenproben von thioharnstoffbehandelten Tieren waren insgesamt geringer als bei den entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 9). Diese Unterschiede waren am 20. und 21. Inkubationstag besonders groß.

Im Gegensatz dazu erreichten die Lungenproben der L-Thyroxingruppe gegenüber der Kontrollgruppe im allgemeinen höhere Extinktionswerte bei der Hämoglobinbestimmung (Abb. 9). Diese waren am 19. Inkubationstag bei atmenden Tieren mit 0,118 bzw. 0,114 gegenüber 0,085 bei gleichaltrigen, nichtatmenden Kontrolltieren signifikant erhöht. Während die Extinktionen der Lungenproben am 20. Tag bei thyroxinbehandelten, schon geschlüpften Küken gegenüber Kontrolltieren in der Luftkammer noch signifikant größer waren, waren diese Unterschiede gegenüber Kontrolltieren, die am 20. Tag schon angepickt hatten, nicht mehr so deutlich.

Auch bei den Hämoglobinwerten fiel auf, daß die Extinktionszunahmen gerade dann besonders hoch waren, wenn die Respiration einsetzte. Diese deutlichen Erhöhungen blieben allerdings bei den Feten der Thioharnstoffgruppe, deren Atmung noch nicht in Gang gekommen war, aus.

Tabelle 2:

Pulmonaler Haemoglobingehalt nach Behandlung mit
Dexamethason bzw. nach Abdichten der Luftkammer

Tage der Bebrütung	Kontrollen	Luftkammer abgedichtet	Dexamethason
	E ₅₄₆ nm		
	Kontrollen	Holzleim	Dexamethason
17	0.062 ± 0.013 n = 14		
18	0.075 ± 0.011 n = 13	0.072 ± 0.009 n = 7	0.063 ± 0.016 n = 7
19	0.085 ± 0.017 n = 30	0.080 ± 0.011 n = 6	0.064 ± 0.012* n = 16
20 a	0.120 ± 0.022 ⁺⁺⁺ n = 23	0.109 ± 0.023 ⁺ n = 23	0.105 ± 0.015 ⁺⁺⁺ n = 10
b	0.138 ± 0.027 ⁺⁺⁺ n = 30	0.125 ± 0.024 ⁺⁺⁺ n = 19	0.102 ± 0.013* n = 13
21	0.153 ± 0.030 n = 16	0.145 ± 0.023 ⁺⁺ n = 7	0.153 ± 0.026 ⁺⁺⁺ n = 7

a = Schnabel in der Luftkammer; b = Eischale angepickt

n = Anzahl der untersuchten Tiere

* = p < 0.01 im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen

+ = p < 0.05, ++ = p < 0.01, +++ = p < 0.001 im Vergleich zum Vortag

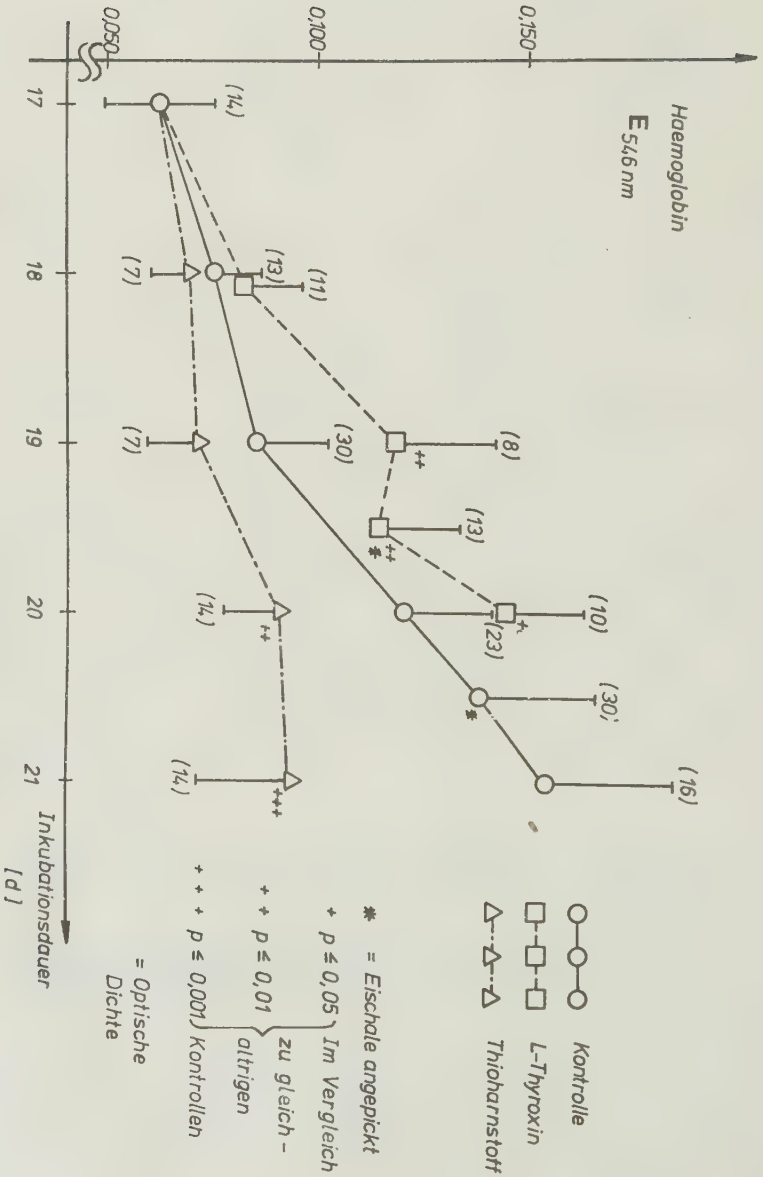


Abb. 9: Einfluß von L-Thyroxin und Thiocarnostoff auf den Verlauf des pulmonalen Haemoglobingehaltes

3.2.4. Verlauf der pulmonalen Angiotensin-converting Enzyme Aktivität

Kontrolltiere:

Bei Lungenproben von unbehandelten Feten (Tab. 3) konnte am 17. Inkubationstag in der Lunge eine Enzymaktivität des Angiotensin-converting-Enzyme von durchschnittlich 1573 μ U/mg Protein festgestellt werden. Sie erhöhte sich am 18. Inkubationstag auf 2561 μ U/mg und am 19. Inkubationstag auf 6884 μ U/mg Protein. Ein weiterer Zuwachs auf 9557 bzw. auf 9161 μ U/mg Protein bei Tieren, die mit ihrem Schnabel in der Luftkammer waren bzw. die schon angepickt hatten, war am 20. Inkubationstag zu beobachten. Die Aktivität nahm am 21. Inkubationstag bei geschlüpften Küken nur mehr auf einen mittleren Wert von 10111 μ U/mg Protein zu. Die Aktivitätszunahmen vom 18. zum 19. Inkubationstag und vom 19. zum 20. Inkubationstag waren signifikant.

Behandelte Tiere:

Ähnlich wie bei den Kontrollen erhöhte sich auch bei den behandelten Tieren die Enzymaktivität im Lauf des Untersuchungszeitraumes (Abb. 10 und Tab. 3). Auch hier war im allgemeinen ein besonders ausgeprägter Anstieg vom 18. zum 19. Inkubationstag festzustellen. Darüberhinaus waren die Aktivitäten der mit Dexamethason und Thioharnstoff behandelten Feten gegenüber den Kontrollen am 19. und am 20. Inkubationstag, sowie bei thioharnstoffbehandelten Tieren am 21. Inkubationstag deutlich erhöht. Die Lungen der mit L-Thyroxin behandelten Tiere wiesen lediglich am 18. Inkubationstag eine

Tabelle 3:

Pulmonale Angiotensin-converting Enzyme Aktivität nach
Behandlung mit Dexamethason bzw. nach Abdichten der
Luftkammer

Tage der Bebrütung	Kontrollen	Luftkammer abgedichtet	Dexamethason
$\mu\text{U/mg Protein}$			
17	1573 $\pm$ 432 n = 7		
18	2561 $\pm$ 1314 n = 7	2754 $\pm$ 1200 n = 7	3451 $\pm$ 1520 n = 7
19	6884 $\pm$ 2971 ⁺⁺ n = 20	6528 $\pm$ 1611 ⁺⁺⁺ n = 6	9193 $\pm$ 3563 ⁺⁺⁺ n = 1
20 a	9557 $\pm$ 3432 ⁺ n = 17	8923 $\pm$ 2857 n = 25	13074 $\pm$ 3371 ⁺ n = 1
b	9161 $\pm$ 2332 ⁺ n = 26	7742 $\pm$ 1998 n = 15	10169 $\pm$ 2885 ⁺ n = 7
21	10111 $\pm$ 3687 n = 14	9916 $\pm$ 1721 n = 6	10858 $\pm$ 3681 n = 7

a = Schnabel in der Luftkammer; b = Eischale angepickt
n = Anzahl der untersuchten Tiere

* = $p < 0.05$ im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen
+ = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$ im Vergleich
zum Vortag

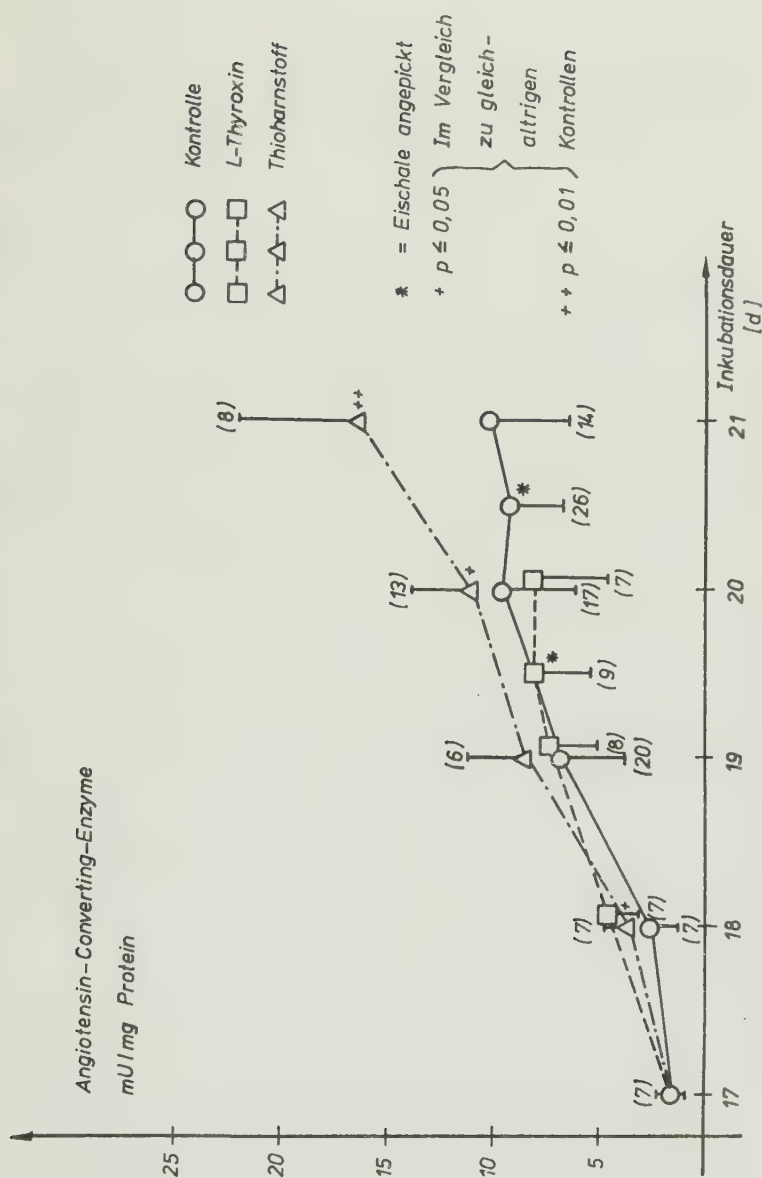


Abb. 10: Einfluß von L-Thyroxin und Thioharnstoff auf den Verlauf der pulmonalen Angiotensin-converting Enzyme Aktivität

signifikant höhere Angiotensin-converting Enzyme Aktivität als die unbehandelten Tiere auf. Die pulmonalen Enzymaktivitäten der Feten, deren Luftkammer mit Holzleim abgedeckt worden war, unterschied sich nicht wesentlich von den Kontrollwerten.

Wie aus Abb. 8 und 10 ersichtlich, war der Anstieg der Kallikreinaktivität in der Lunge im Gegensatz zum Angiotensin-converting Enzyme im Bereich vom 19. zum 20. und zum 21. Tag besonders ausgeprägt. Bei der L-Thyroxin-gruppe trifft dies für den Zeitraum vom 18. zum 19. und zum 20. Inkubationstag zu. Da in diesem Zeitraum auch die Lungenatmung einsetzt, interessierte im folgenden Versuch, ob während dieser Periode eine Korrelation zwischen dem Fortschreiten der Atemtätigkeit auf der einen Seite und der Kallikreinaktivität und dem Hämoglobingehalt der Lunge auf der anderen Seite besteht. Auch das Verhalten der pulmonalen Angiotensin-converting Enzyme Aktivität während dieser Zeit war von Interesse. Aus diesem Grund wurde der Beginn der Respiration automatisch (s.o.) verfolgt. 3, 8, 15 und 22 Stunden nach Beginn der Atmung wurden die genannten Parameter in der Lunge untersucht. Neben Kontrolltieren wurden in diese Untersuchungen auch Feten einbezogen, deren Luftkammer mit Holzleim abgedeckt worden war, um zu prüfen, ob auch einer Hypoxie, die für das Einsetzen der Atmung und den Zeitpunkt des Anpickens von Bedeutung ist, ein Einfluß auf diese Parameter zukommt. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, nimmt sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit Holzleim behandelten Tieren die pulmonale Kallikreinaktivität von der 3. bis zur 22. Stunde nach Atmungsbeginn steil zu. Im Gegensatz dazu war beim Angiotensin-converting Enzyme in diesem Zeitraum kein Anstieg der Aktivität zu beobachten und bei den mit Holzleim behandelten Feten sogar eine Aktivitätsabnahme angedeutet (Abb. 13). Der Hämoglobingehalt der Lunge erhöhte sich im untersuchten Zeitraum sowohl bei den

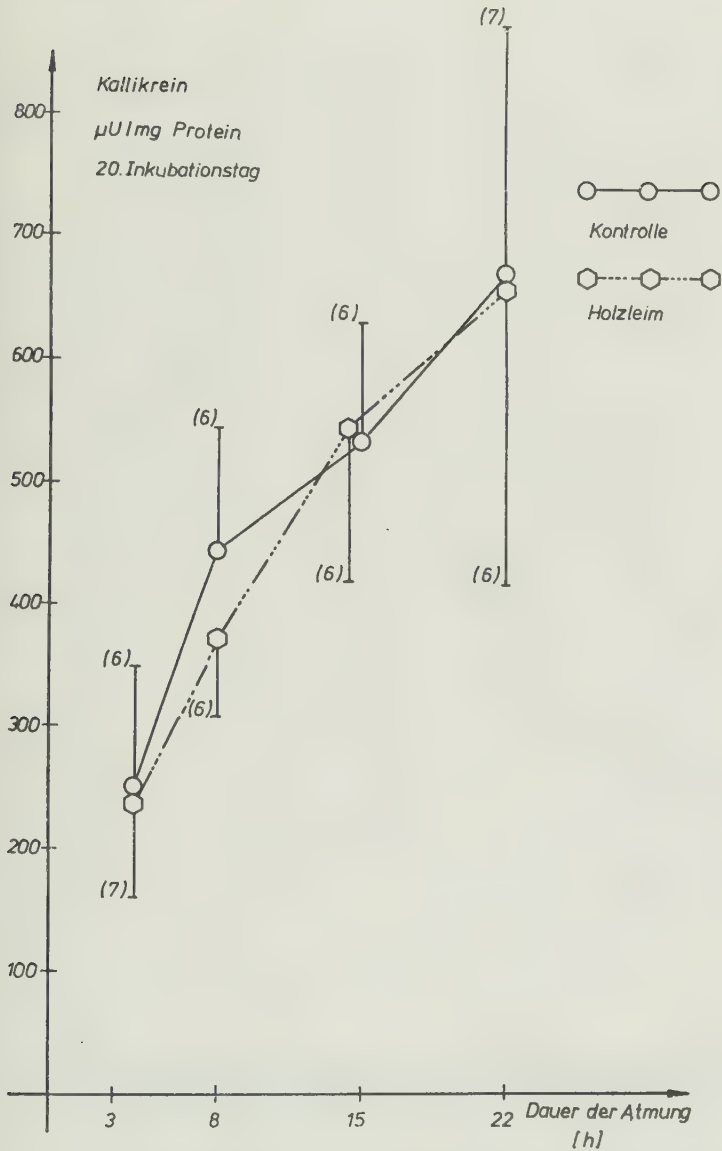


Abb. 11: Einfluß des Abdichtens der Luftkammer
 auf die pulmonale Kallikreinaktivität
 in der "parafetalen Phase"

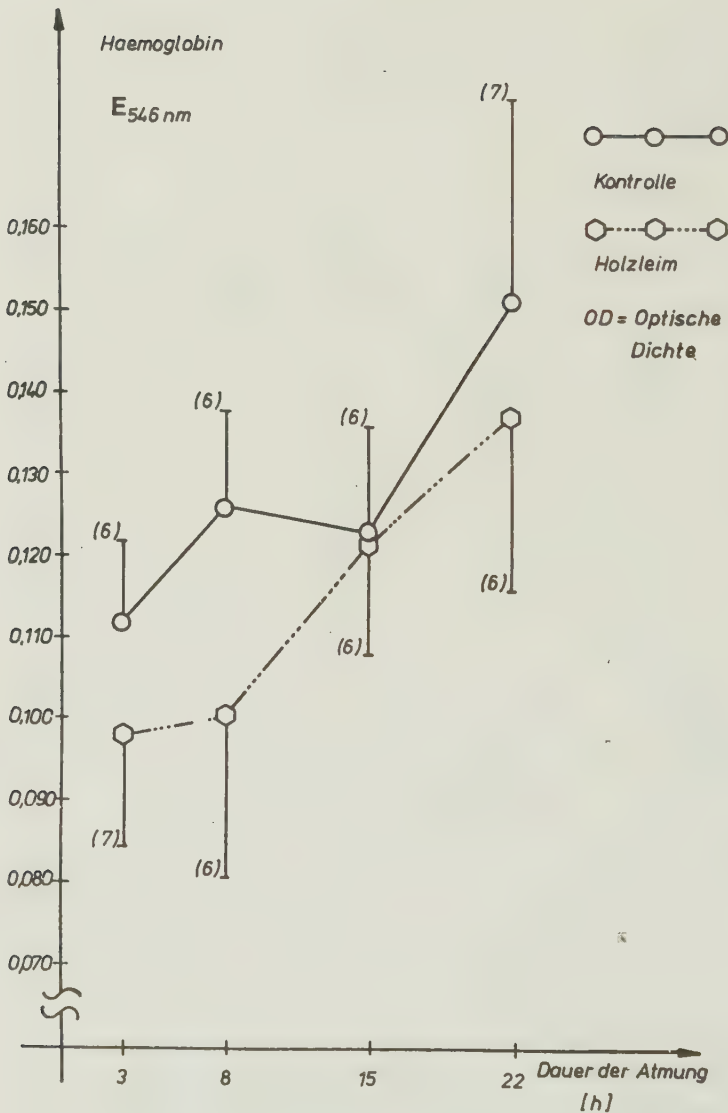


Abb. 12: Einfluß des Abdichtens der Luftkammer auf den pulmonalen Haemoglobingehalt in der "parafetalen Phase"

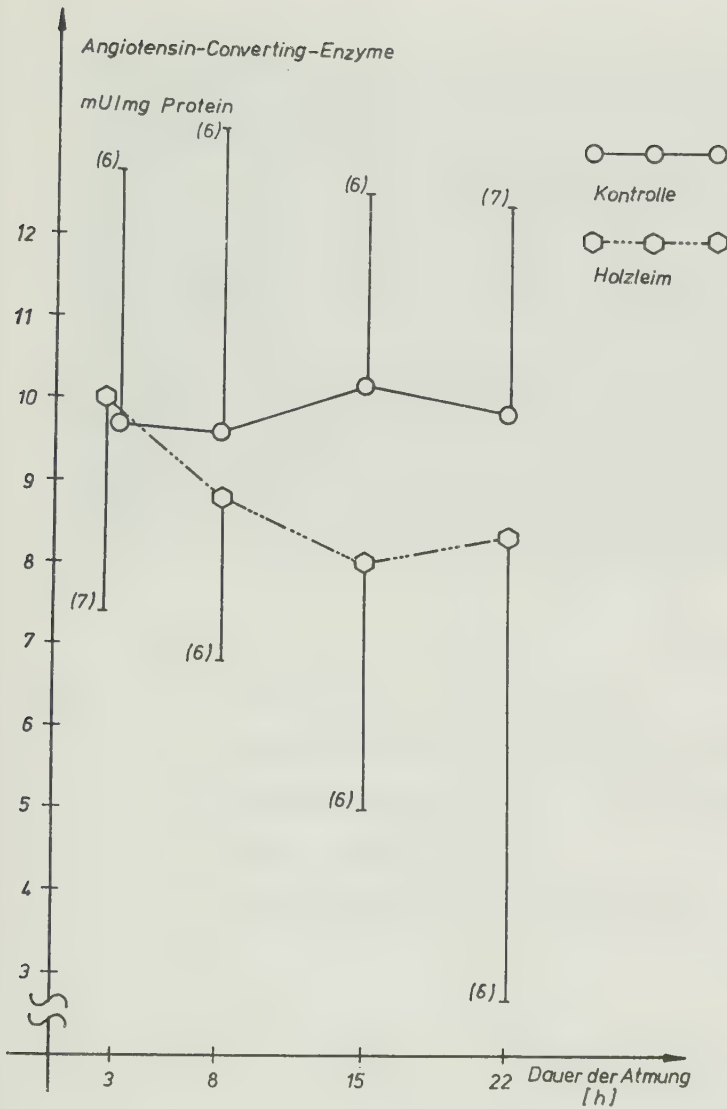


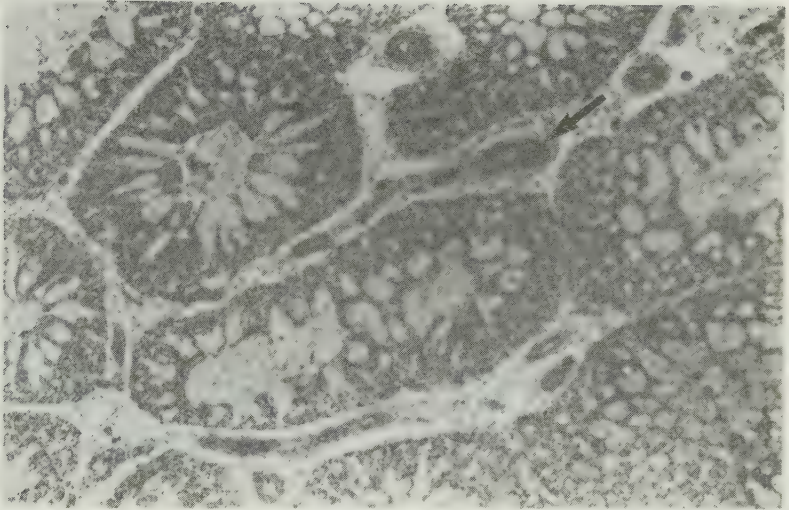
Abb. 13: Einfluß des Abdichtens der Luftkammer auf die pulmonale Angiotensin - converting Enzyme Aktivität in der "parafetalen Phase"

Kontrollen als auch bei den Feten mit abgedichteter Luftkammer. Während der pulmonale Hämoglobingehalt bei den mit Holzleim behandelten Feten kontinuierlich anstieg, fiel bei den Kontrollen ein leichter Abfall von der 8. bis zur 15. Stunde nach Respirationsbeginn auf (Abb 12).

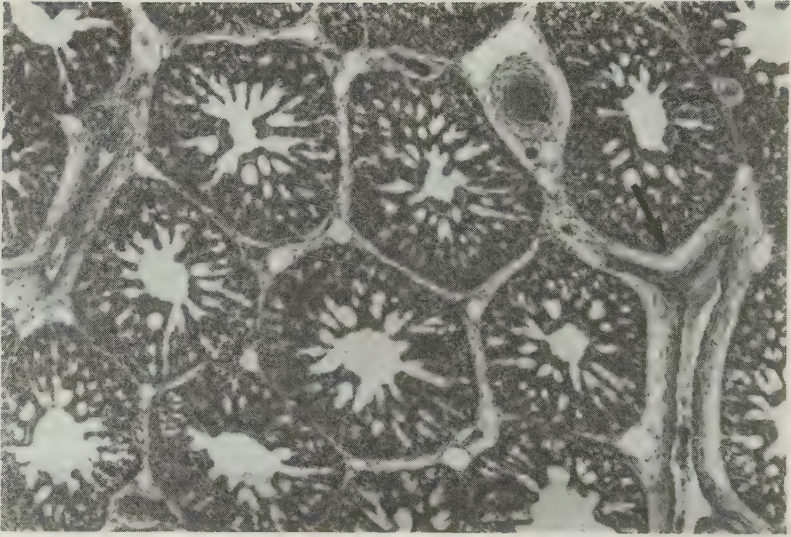
Wegen der deutlichen Wirkung, die der Thioharnstoff auf die Lungenentwicklung der Hühnerfeten ausübt, wurden letztlich auch die morphologischen Veränderungen der Lunge nach Thioharnstoffgabe untersucht. Dazu wurden Lungenschnitte hergestellt.

Abb. 14a zeigt den Schnitt durch die Lunge eines mit Thioharnstoff behandelten Fetus am 20. Inkubationstag, der noch nicht in der Luftkammer und dessen Lunge noch nicht beatmet war. Hierbei fällt besonders auf, daß die Luftkapillaren mit Flüssigkeit gefüllt sind, und daß die Gefäße noch kollabiert sind.

Abb. 14b zeigt das Lungenpräparat eines gleichaltrigen Kontrolltieres, dessen Lungen bereits beatmet waren: Die Luftkapillaren sind frei von Flüssigkeit, die Gefäße sind gut ausgebildet und weisen ein deutliches Lumen auf.



*Abb. 14 a: Thioharnstoff 20. Bebrütungstag:
Lungen nicht beatmet - deutlich erkennbare
Flüssigkeitsansammlungen in den Luftkapillaren
Gefäße kollabiert (Pfeil)
Lungenschnitt: Vergrößerung 10 x 10*



*Abb. 14 b: Kontrolle 20. Bebrütungstag:
Lungen beatmet - Luftkapillaren frei von
Flüssigkeit; Gefäße mit deutlichem
Lumen (Pfeil)
Lungenschnitt: Vergrößerung 10, x 10*

4. DISKUSSION

Einen entscheidenden Entwicklungsschritt beim Übergang von der prae- in die neonatale Phase stellt die Entfaltung der Lunge dar. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, kommt bei diesem Vorgang den zirkulatorischen Veränderungen eine große Bedeutung zu. Das Einsetzen der Lungenatmung und das Ingangkommen der funktionellen Lungendurchblutung sind untrennbar miteinander verbunden. Als Mediatoren für diese Kreislaufumstellung werden eine Reihe von Substanzen diskutiert. In der Literatur wird dabei beim Säuger vor allem dem Bradykinin eine maßgebliche Funktion zugeschrieben. Bei der Geburt kommt es zur pulmonalen Vasodilation - der pulmonale Gefäßwiderstand sinkt um das 5 - 10 - fache ab (20), - Konstriktion des Ductus arteriosus und der Nabelgefäße. Eine dilatierende Wirkung des Bradykinins auf die Lungengefäße beim erwachsenen Säuger (7,22,24,109) sowie bei Feten mit intakter Nabelschnur kurz vor der Geburt (1,10,44,52) wurde bereits nachgewiesen. Daneben haben in-vitro-Versuche ergeben, daß Bradykinin den Ductus arteriosus des fetalen Lammes oder Meerschweinchens (56) sowie menschliche Nabelarterien (19,28) kontrahieren kann. Es bleibt aber ungeklärt, ob der verminderte Blutfluß durch den Ductus arteriosus und die Nabelgefäße durch die aktive Konstriktion dieser Gefäße oder durch die Umverteilung des Blutvolumens aufgrund der erhöhten Lungendurchblutung zustande kommt (1). Untersuchungen von Heymann et al. (52) und Gilbert et al. (44) weisen darauf hin, daß dabei die Bildung des Bradykinins in der fetalen Lunge selbst geschieht. Es bleibt aber zu erwähnen, daß diese Vorgänge letztlich nicht geklärt sind. Einerseits stellt der Säugerembryo nämlich ein relativ schwer zugängliches Versuchsobjekt dar, andererseits erlaubt die sehr schnell einsetzende Atmung bei der Geburt auch keine länger dauernde Untersuchungsmöglichkeit der physiologischen Veränderungen.

Auch beim Vogel werden entsprechende Veränderungen der Durchblutung beim Schlupf notwendig, nämlich: Konstriktion des Ductus arteriosus, Verschluß der intraatrialen Foramina, die dem Foramen ovale des Säugers entsprechen, Verschluß des Ductus venosus und Versiegen des Chorioallantoiskreislaufs, während die Lungendurchblutung einsetzt (33).

Über das Verhalten des Kininsystems in der perinatalen Phase des Vogels liegen bisher keine Befunde vor. Die vorhandenen Kenntnisse über das aviäre Kallikrein-Kinin-System gehen auf Untersuchungen von Werle zurück (115). Werle extrahierte eine Protease aus dem Pankreas und Kot von Hühnern und ordnete dieses Enzym aufgrund seiner Wirkung auf das Gefäßsystem dem Kallikrein zu. Die ersten Versuche der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Werle. Ähnlich wie bei Werle erniedrigten die Extrakte aus dem Pankreas den Blutdruck des Huhnes (Abb. 4a). Auch nach grober Anreicherung dieser Extrakte durch Acetonfällung konnte eine Blutdrucksenkung hervorgerufen werden (Abb. 4c). Weitere Versuche zeigten außerdem, daß nach Abkochen der angereicherten Proben die Wirkung auf den Blutdruck verschwindet. Offensichtlich ist unter diesen Umständen die Aktivität dieser Substanz zerstört worden, was eine Proteinnatur vermuten läßt. Es ist die Vermutung naheliegend, daß die Wirkung durch die enzymatische Freisetzung aktiver Substanzen im Organismus und nicht durch Verabreichung blutdrucksenkender, hitzestabiler Peptide wie Histamin oder Bradykinin verursacht wird.

Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Studie das Ornithokallikrein näher charakterisiert. Dazu wurde ebenfalls das Pankreas verwendet, da es für seinen hohen Gehalt an Proteasen bekannt ist. Die Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie mit dem Stufengradienten zeigen, daß aus dem Hühnerpankreas mehrere Fraktionen

erhalten werden, die den arteriellen Blutdruck senken können (Abb.4b). Die Blutdrucksenkung alleine kann aber nicht als einziges Merkmal des Kallikreins angesehen werden. Wie aus Untersuchungen am Säuger bekannt ist, ist nämlich für Gewebekallikrein typisch, daß es zwar mit Aprotinin gehemmt werden kann, daß aber SBTI keine Wirkung hat (36). Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen (Abb. 2a), weist eine der blutdrucksenkenden Pankreasfraktionen diese Merkmale auf. Diese Versuche machen deutlich, daß beim Huhn eine Substanz existiert, deren Aktivitätsverhalten und vasoaktive Eigenschaften dem Gewebekallikrein des Säugers entsprechen. Darüber hinaus sind beim Huhn offensichtlich auch andere Serinproteasen in der Lage, nach intravenöser Applikation eine Blutdrucksenkung zu bewirken (Abb. 4c). Beim Säuger ist ein solches Phänomen nicht bekannt, wahrscheinlich wegen des hohen Gehalts an alpha-1-Antitrypsin im Blut (Dr. Geiger, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Chirurgische Klinik Innenstadt der Universität München, persönliche Mitteilung).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das Molekulargewicht des Ornithokallikreins mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Dazu wurden die kallikreinhaltigen Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie mit dem linearen Gradienten verwendet. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, konnte ein Molekulargewicht von 30500 d für das Ornithokallikrein ermittelt werden. Für humanes Gewebekallikrein aus dem Pankreas wird in der Literatur (53) ein Molekulargewicht von 27000 d (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) bzw. von 40000 d (Gelfiltration mit Ultrogel AcA-44) beschrieben. Demnach sind das aviäre Kallikrein und das Säugerkallikrein vom Molekulargewicht her weitgehend ähnlich, produzieren aber ein sehr unterschiedliches Produkt. So ist das Ornithokinin sechs bis sieben mal größer als

humanes Kinin. Das gleiche Verhalten gegenüber den spezifischen Inhibitoren SBTI und Aprotinin läßt aber eine ähnliche Struktur des aktiven Zentrums vermuten. Aprotinin inaktiviert nämlich das Enzym dadurch, daß es sich im aktiven Zentrum mit dem Serin verbindet (39). Zur weiteren Charakterisierung dieses Enzyms wäre sein natürliches Substrat, das Ornithokininogen erforderlich. Diese Substanz stand aber für die vorliegenden Untersuchungen nicht zur Verfügung. Ihre aufwendige Isolierung hätte allerdings den Rahmen dieser Arbeit überschritten.

Nachdem gezeigt worden war, daß im Pankreas des Huhnes eine Protease existiert, die sich wie das Gewebekallikrein der Säuger verhält, wurde im weiteren Verlauf dieser Studie die fetale Lunge untersucht.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich, konnte auch in der Lunge eine Protease gefunden werden, die sich hinsichtlich ihrer Aktivität und Hemmbarkeit ebenso verhält wie das Kallikrein aus dem Pankreas und deshalb als Ornithokallikrein bezeichnet werden kann.

Aus der Literatur ist bekannt, daß das Kallikrein-Kinin-System gerade bei der Lungenentfaltung eine große Rolle spielt, wobei der Lunge selbst eine regulierende Funktion zugeschrieben wird (65). Es interessierte deshalb der Verlauf der pulmonalen Kallikreinaktivität in Abhängigkeit von der Entwicklung. Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, steigt bei unbehandelten Kontrolltieren die pulmonale Kallikreinaktivität vom 17. bis zum 21. Bebrütungstag an. Dieser Anstieg ist besonders ausgeprägt vom 19. zum 20. Bebrütungstag, also zu dem Zeitpunkt, an dem die Lungenatmung einsetzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit eine deutliche Parallelität des Verlaufs der pulmonalen Kallikreinaktivität mit der Entfaltung der Lunge.

Wie aus Abb. 9 zu ersehen ist, verändert sich parallel zur Kallikreinaktivität auch der Hämoglobingehalt der Lunge. Dies läßt sich auch aus dem Korrelationskoeffizienten von $R = 0,99$ entnehmen, der mit Hilfe der linearen Regression ermittelt wurde. Daß der Hämoglobingehalt mit der einsetzenden Atmung ansteigt, konnte auch schon Hammel zeigen (50). Die Ergebnisse dieser Arbeit - besonders die enge Korrelation zwischen Kallikreinaktivität und Atmung sowie Lungendurchblutung - festigen die Hypothese, daß die funktionelle Lungendurchblutung beim Vogel wie beim Säuger durch die gefäßdilatierende Wirkung des Bradykinins hervorgerufen wird.

Es stellt sich die Frage, ob die Kallikreinaktivität eine Grundvoraussetzung für das Ingangkommen der Atmung darstellt, oder ob erst mit Beginn der Atmung die Enzymaktivität steigt und somit die Lungendurchblutung einsetzen kann. Die Untersuchungen von Vince zeigen, daß sich bereits vor dem Einsetzen der Lungenatmung Luft in den Luftsäcken befindet (101). Möglicherweise stimuliert diese in den Atemwegen vorhandene Luft die Lungendurchblutung und den Beginn der Atemtätigkeit.

Auch beim Säuger soll der Sauerstoff, der der Lunge mit Beginn der Atmung zugeführt wird, eine Steigerung der Bradykininfreisetzung in der Lunge hervorrufen (52).

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, wird das vom Kallikrein gebildete Kinin vom Angiotensin-converting Enzyme wieder abgebaut. Ornithokinin stand bei der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Die Wirksamkeit des Angiotensin-converting Enzyme beim Huhn wurde daher mit Hilfe von Angiotensin I, dem anderen Substrat dieses Enzyms (Abb. 1), aufgezeigt. Intravenös verabreichtes Angiotensin I bewirkt auch beim Huhn eine deutliche Erhöhung des arteriellen Blutdrucks (Abb. 5). Diese Wirkung ist auf die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II

zurückzuführen. Damit übernimmt dieses Enzym beim Vogel wohl dieselbe Funktion wie beim Säuger. Das Angiotensin-converting Enzyme ist beim Säuger im Gegensatz zum Kallikrein, welches sich innerhalb der Zelle befindet, an den endothelialen Oberflächen der Gefäßmembran lokalisiert. Eine unterschiedliche Lokalisation der beiden Enzymsysteme scheint auch beim Huhn zu bestehen. Während das Kallikrein nämlich im Überstand des Lungenhomogenats gefunden wurde, konnte das Angiotensin-converting Enzyme nur unter Zugabe von Detergentien aus dem Pellet in Lösung gebracht werden.

Wie aus der Abb. 10 ersichtlich ist, weist die Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme der Kontrollen einen anderen Verlauf auf als die des Kallikreins. Beim Angiotensin-converting Enzyme ist der ausgeprägte Aktivitätszuwachs bereits vom 18. zum 19. Inkubationstag vorhanden. Im Laufe der weiteren Entwicklung nimmt aber die Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme nicht mehr in dem Ausmaß zu wie beim Kallikrein, sondern erreicht in der "parafetalen Phase" eine Art Plateau, um dann bis zum Schlupf wieder leicht anzusteigen.

Das Angiotensin-converting Enzyme korreliert, wegen seiner Lokalisation an den endothelialen Oberflächen der Gefäßmembranen stark mit der Gefäßausbildung. Wigger und Stalcup bezeichnen es sogar als guten "Marker" bei der Identifizierung der fetalen Organvaskularisation (117).

Es liegt daher die Vermutung nahe, daß der Anstieg des Angiotensin-converting Enzyme auch beim Vogel die Vaskularisierung der fetalen Lunge widerspiegelt.

Darüber hinaus ist ein funktionell ausgereiftes Angiotensin-converting Enzyme wichtig für den Abbau des Kinins, welches durch das Kallikrein gebildet wird.

Die Kinine sind hochwirksame Peptide, die für den Organismus sehr schädlich sein können, wenn sie in zu

großem Maße gebildet werden und in den Kreislauf gelangen. So wird beim neugeborenen Menschen ein Zusammenhang zwischen überschießender Kininbildung und den Symptomen des "respiratory distress syndrome" diskutiert (87,88). Es erscheint deshalb auch beim Hühnerfetus sinnvoll, daß die Kallikreinaktivität von einem Anstieg der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität begleitet wird. Nur so ist gewährleistet, daß die Kinine, die vom Kallikrein gebildet werden und die Dilation der Gefäße hervorrufen, in der Lunge selbst wieder rechtzeitig abgebaut werden, bevor sie in den Kreislauf gelangen.

Auffällig ist aber, daß die spezifische Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme in der "parafetalen Phase" annähernd konstant bleibt, während beim Kallikrein die Aktivität zunimmt. Dieses Verhalten konnte besonders deutlich in den Abb. 11 und 13 gezeigt werden, in denen der zeitliche Verlauf der beiden Enzymaktivitäten näher registriert wurde. Dabei fällt beim Angiotensin-converting Enzyme auf, daß die Aktivität bei den Kontrollen konstant bleibt, während bei den Feten, deren Luftkammer mit Holzleim abgedeckt worden war, es sogar zu einem leichten Abfall der Enzymaktivität kommt. Vom Angiotensin-converting Enzyme ist bekannt, daß mangelnder Sauerstoffpartialdruck in der Atemluft hemmend wirkt (59,93). Möglicherweise ist die in der "parafetalen Periode" zu erwartende Hypoxie (s.o.) die Ursache für die Unterbrechung des Anstiegs der Enzymaktivität. Bei den Feten, deren Luftkammer mit Holzleim abgedichtet wurde, ist eine stärkere Hypoxie in dieser Periode zu erwarten (123). Dies ist möglicherweise auch die Ursache für die geringere Angiotensin-converting Enzyme Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen.

Im Gegensatz dazu konnte die pulmonale Kallikreinaktivität durch die Provokation einer Hypoxie nicht beeinflusst werden (Abb. 11).

Dieses Verhalten hat möglicherweise eine physiologische Bedeutung. Ein fortlaufender Anstieg der Kallikreinaktivität bei gleichbleibender Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme in dieser Zeit läßt eine erhöhte Nettobradykininfreisetzung vermuten, wodurch die Durchblutung der Lunge begünstigt wird (Abb. 12).

Die charakteristischen Veränderungen der beiden untersuchten Enzymsysteme verhalten sich auch bei den mit L-Thyroxin behandelten Feten ähnlich wie bei den Kontrolltieren. Die zu beobachtenden Veränderungen sind lediglich schon 24 Stunden früher vorhanden. Beim Angiotensin-converting Enzyme kommt es bereits vom 17. zum 18. Bebrütungstag zu einem steileren Anstieg der Aktivität und die Plateaubildung ist um 24 Stunden vorverlegt (Abb. 10). Die deutliche Zunahme der pulmonalen Kallikreinaktivität und des Hämoglobingehaltes der Lunge findet schon vom 18. zum 19. Bebrütungstag statt (Abb. 8 und 9). Diese Befunde stimmen damit überein, daß das L-Thyroxin die Lungenentwicklung und die Lungenentfaltung beschleunigt. Offensichtlich kommt es unter dem Einfluß von L-Thyroxin zu einer beschleunigten Vaskularisierung der Lunge und somit zu einem vorzeitigen Anstieg der Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme. Ferner bewirkt L-Thyroxin eine vorzeitige Einleitung der Lungendurchblutung, an der eine vermehrte Kininfreisetzung durch Kallikrein beteiligt sein dürfte. Auf eine vorzeitige Einleitung der Lungenzirkulation deutet der vorzeitige Anstieg des pulmonalen Hämoglobingehaltes hin. Daneben verursacht L-Thyroxin auch eine vorzeitige Ausbildung der Hypoxie in der "parafetalen Periode", die sich in einer vorzeitigen Plateaubildung der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität zeigt (Abb. 10). In der Literatur wird eine Beschleunigung der Lungenreifung unter dem Einfluß von L-Thyroxin auf der Stufe der Surfactantbildung beschrieben (77,81,91,124). Frühere Untersuchungen am Vogel bestätigen diese Befunde

beim Säuger aber nicht (50). Auch die eigenen Untersuchungen lassen vermuten, daß die Beschleunigung des Beginns der Respiration hauptsächlich durch die Effekte des L-Thyroxins auf die Zirkulation zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu L-Thyroxin löst Dexamethason weder eine vorzeitige Respiration noch einen vorzeitigen Schlupf aus. Ein Blick auf die Tab. 1 zeigt, daß Dexamethason auch keine Wirkung auf die Ornithokininproduktion durch Kallikrein ausübt. Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren treten eher beim Angiotensin-converting Enzyme und beim Hämoglobin auf (Tab. 2 und 3). Diese sind aber nicht sehr ausgeprägt. Offensichtlich greift Dexamethason nicht auf der Ebene der Zirkulation in die Lungenentwicklung ein. Geht man davon aus, daß unter diesen Umständen die Surfactantsynthese stimuliert wird, wie frühere Versuche gezeigt haben (17,60), so würden die vorliegenden Ergebnisse dafür sprechen, daß eine Stimulierung der Surfactantsynthese alleine nicht ausreicht, den Beginn der Lungenatmung zu forcieren, solange nicht die notwendigen zirkulatorischen Veränderungen vorhanden sind.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Thioharnstoff besonders drastisch auf die fetale Entwicklung einwirkt. So konnte mit Thioharnstoff sowohl die Ausbildung der Lungenatmung als auch der Schlupf verzögert oder sogar vollständig unterdrückt werden (50,120,122). Diese Auswirkungen konnten auch in der vorliegenden Studie festgestellt werden. Darüber hinaus führte die Behandlung mit Thioharnstoff zu besonders auffälligen Effekten. Einerseits bleibt die pulmonale Kallikreinaktivität auf einem sehr niedrigen Niveau (Abb. 8), andererseits ist im Vergleich zu den Kontrollen eine vermehrte Ausbildung des Angiotensin-converting Enzyme zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß sehr wenig Ornithokinin freigesetzt werden kann, und daß das freigesetzte Ornithokinin sehr schnell

wieder abgebaut wird. Als Folge davon sollte es zu einer Beeinträchtigung der Zirkulation kommen. Dafür sprechen die vorliegenden Befunde der Hämoglobinbestimmung, die zeigen, daß die Durchblutung der Lunge bei dieser Gruppe nicht in dem Maße einsetzt wie bei der Kontrollgruppe (Abb. 9).

Die hemmende Wirkung des Thioharnstoffs auf die Lungenentwicklung wird auch durch die histologischen Befunde unterstrichen (Abb. 14a). Offensichtlich kann bei diesen Tieren die Flüssigkeit, die sich in den Luftkappillaren der fetalen Lunge befindet nicht resorbiert werden, solange die funktionelle Durchblutung der Lunge nicht einsetzt. Ein ausreichender Gaswechsel in der Lunge ist aber erst nach der Resorption dieser Flüssigkeit möglich.

Es ist zunächst die Vermutung naheliegend, daß der Thioharnstoff als Thyreostatikum seine Wirkung entfaltet. Untersuchungen haben gezeigt, daß unter den gleichen Bedingungen der Thyroxinspiegel sehr niedrig ist (119). Es hat sich aber bei anderen Versuchen (50) gezeigt, daß der Thioharnstoff Effekte erzielt, die nicht mit einer thyreostatischen Wirkung alleine zu erklären sind. Demnach sind andere, noch unbekannte Wirkungsweisen des Thioharnstoffs nicht auszuschließen. Außerdem ist bekannt, daß unter dem Einfluß von Thioharnstoff die Synthese der Leukotriene stimuliert wird (18). Diese Verbindungen, die sich von der Arachidonsäure ableiten, sollen eine vasokonstriktorische Wirkung auf die Lungengefäße ausüben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß das Kallikrein-Kinin- und das Angiotensin-Renin-System des Vogels beim Schlupf eine ähnlich wichtige Rolle spielen wie bei der Geburt der Säuger. Ein Entgleisen des Zusammenspiels beider Systeme, wie unter dem Einfluß von Thioharnstoff deutlich wird, beeinträchtigt die Lungenentfaltung.

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen auch, daß sich der Vogelfetus für Verlaufsuntersuchungen in der perinatalen Zeit besonders eignet. Gerade wegen der langen Dauer der "parafetalen Phase" kann in dieser Übergangszeit von der "Chorioallantoisatmung" zur "Lungenatmung" ein abgestuftes Regulationssystem über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet werden. Außerdem kann beim Vogel das Schlupfgeschehen durch verschiedene Manipulationen beeinflusst werden, die einen Einblick in die physiologischen Vorgänge, die sich zum Zeitpunkt des Schlupfes abspielen, ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde das aviäre Kallikrein, Ornithokallikrein, charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß im Pankreas und in der Lunge des Huhnes eine Protease existiert, die sich mit Aprotinin, aber nicht mit dem Sojabohnentrypsininhibitor hemmen läßt. Damit zeigt diese Protease Eigenschaften, die vom Gewebekallikrein des Säugers bekannt sind.

Anschließend wurde das Enzym über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel angereichert und mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese das Molekulargewicht (30.500 d) bestimmt.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Aktivitätsverlauf des Ornithokallikreins und des Angiotensin-converting Enzyme in der Lunge im Endabschnitt der Fetogenese untersucht.

Die Aktivität beider Enzyme steigt gegen Ende der Inkubation an, wobei das Kallikrein einen besonders deutlichen Aktivitätsanstieg um die Zeit der einsetzenden Lungenatmung entfaltet und der Anstieg der Aktivität des Angiotensin-converting Enzyme in der "parafetalen Phase" unterbrochen wird.

Die Veränderungen der Zirkulation, gemessen anhand des pulmonalen Haemoglobingehalts, vollziehen sich parallel zum Aktivitätsverlauf des Kallikreins.

Der Verlauf der Aktivitäten der beiden Enzyme konnte durch Eingriffe in die Entwicklung beeinflußt werden.

L-Thyroxin, das eine Beschleunigung der Lungenentwicklung auslöst, führt zu einem vorzeitigen Anstieg der Kallikreinaktivität und zu einer vorzeitigen Unterbrechung des Anstieges der Angiotensin-converting Enzyme Aktivität.

Unter dem Einfluß von Thioharnstoff hingegen, der die Lungenentfaltung verhindert, bildet sich die Zunahme der Kallikreinaktivität um den 19./20. Tag nicht aus, außerdem wird der Aktivitätsanstieg des Angiotensin-converting Enzyme nicht unterbrochen.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird ersichtlich, daß dem Kallikrein und dem Angiotensin-converting Enzyme eine wichtige Funktion bei der Einleitung der funktionellen Durchblutung und damit bei der Entfaltung der Lunge zukommt.

Im Gegensatz zum Thioharnstoff und zum L-Thyroxin verursachte Dexamethason keine ausgeprägten Veränderungen des Aktivitätsverlaufs dieser Enzyme. Offensichtlich kommt der vom Säugetier bekannte stimulierende Effekt der Glucocorticoide auf die Lungenreifung nicht über einen Eingriff in die Zirkulation zustande.

6. SUMMARY

On the function of avian kallikrein - kinin and angiotensin - renin - system in relation to the release of lung respiration of chicks.

In the first part of the thesis avian kallikrein, ornithokallikrein, is characterized.

In the pancreas and in the lungs of chickens there exists a protease which is inhibited by aprotinin but not by soybean trypsin inhibitor. Thus this protease shows characteristics which are common to mammalian kallikrein.

The enzyme was then concentrated by ion-exchange chromatography on DEAE-sephacel and the molecular weight (30.500) was determined with the help of SDS-polyacrylamid gelelectrophoresis.

In the second part of the thesis, the activity time course of ornithokallikrein and angiotensin-converting enzyme in the lungs during the last part of fetal development was investigated.

Both enzymes increase around the end of incubation, with kallikrein activity increasing dramatically at the time the lungs begin functioning, and angiotensin-converting enzyme activity increasing until interrupted in the "parafetal period".

Circulatory changes, determined by pulmonary hemoglobin content, parallel the activity time course of kallikrein.

The course of activity of the two enzymes can be influenced by operations during the development.

L-thyroxin, which accelerates pulmonary development, leads to an early increase in kallikrein activity and to an early interruption of the increasing angiotensin-converting enzyme activity. With thiourea, which prevents

lung development, kallikrein activity on the 19./20. day does not increase, and the increasing activity of angiotensin-converting enzyme is not interrupted.

The present results make it clear that kallikrein and angiotensin-converting enzyme play an important role in the introduction of functional circulation of the lung and thus of pulmonary respiration.

In contrast to thiourea and L-thyroxin, dexamethason produced no significant change in the activity time course of these enzymes. The stimulating effect of glucocorticoids on lung development, as seen in mammals, is thus not due to any effect on the circulation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Assali, N.S., G.H. Johnson, C.R. Brinkman III, D.J. Huntsman, (1971)
Effects of bradykinin on the fetal circulation.
Am. J. Physiol. 221, 1375 - 1382.
2. Atkinson, A.B., J.I.S. Robertson, (1979)
Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure.
Lancet 2, 836 - 839.
3. Bakhle, Y.S., A.M. Reynard, and J.R. Vane, (1969)
Metabolism of the angiotensin in isolated perfused tissues.
Nature (Lond.) 222, 956 - 959.
4. Ballard, P.L., and R.A. Ballard, (1974)
Cytoplasmic receptor for glucocorticoids in lung of the human fetus and neonate.
J. Clin. Invest. 53, 477 - 486.
5. Betke, K., und W. Savelsberg, (1950)
Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhäoglobin.
Biochem. Z. 320, 431 - 439.
6. Beyer, R.E., (1952)
The effect of thyroxine upon the general metabolism of the intact embryo.
Endocrinology 50, 497 -503.
7. Bishop, J.M., P. Harris, and N. Segal, (1963)
The effect of bradykinin on the pulmonary and systemic circulation in man.

J. Physiol., London 165, 37p.

8. Blackburn, W.R., J.S. Kelly, P.S. Dickmann, H. Travers, M.A. Lopota, and R.A. Rhoades, (1973)
The role of the pituitary-adrenal-thyroid axes in lung differentiation.
II. Biochemical studies of developing lung in anencephalic fetal rats.
Lab. Invest. 28, 352 - 360.
9. Blackburn, W.R., H. Travers, and D.M. Potter, (1972)
The role of the pituitary-adrenal-thyroid axes in lung differentiation.
I. Studies of the cytology and physical properties of anencephalic fetal rat lung.
Lab. Invest. 26, 306 - 316.
10. Campbell, A.G.M., G.D. Dawes, A.P. Fishman, A.I. Hyman, and A.M. Perks, (1968)
Release of a bradykinin-like pulmonary vasodilator substance in foetal and newborn lambs.
J. Physiol., London 195, 83 - 96.
11. Cherniack, N.S., N.H. Edelman, and S. Lahiri, (1970/71)
Hypoxia and hypercapnia as respiratory stimulants and depressants.
Resp. Physiol. 11, 113 - 126.
12. Chiswick, M.L., A. Ahmed, P.M.B. Jack, and R.D.G. Milner, (1973)
Control of fetal lung development in the rabbit.
Arch. Dis. Child. 48, 709 - 713.
13. Comline R.S., and M. Silver, (1972)
The composition of foetal and maternal blood during

parturition in the ewe.

J. Physiol. Lond. 222, 233 - 256.

14. Cuestas, R.A., A. Lindall, and R.R. Engel, (1976)
Low thyroid hormones and respiratory- distress
syndrome of the newborn.
Studies on cord blood.
N. Engl. J. Med. 295, 297 - 302.
15. Cushman, D.W., and H.S. Cheung, (1971)
Spectrophotometric assay and properties of the
angiotensin-converting enzyme of rabbit lung.
Biochem. Pharmacol. 20, 1637 - 1648.
16. Cushman, D.W., and H.S. Cheun, (1971)
Concentrations of angiotensin-converting enzyme in
tissues of the rat.
Biochim. Biophys. Acta, 250, 261 - 265.
17. Dameron, F. and L. Marin, (1978)
The endocrine control of embryonic lung maturation
in the chicken.
II. Role of hypophysis.
Anat. Embryol. 152, 235 - 241.
18. Dauber, J., W. Pluss, K. Stenmark, J. Weiß, and L.
Voelkl, (1983)
Leucotriens in thiourea induced lung injury edema.
Am. Rev. Resp. Dis. 127, 304 - 311.
19. Davignon, J., R.R. Lorenz, and J.T. Shepherd, (1965)
Response of human umbilical artery to changes in
transmural pressure.
Am. J. Physiol. 209, 51 - 59.

20. Dawes, G.S., J.C. Mott, J.G. Widdicombe, and D.G. Wyatt, (1953)
Changes in the lungs of the new-born lamb.
J. Physiol., London, 121, 141 - 162.
21. Dawes C., and K. Simkiss, (1969)
The acid base status of the blood of developing chick embryo.
J. exp. Biol. 50, 79 - 86.
22. De Freitas, F.M., E.Z. Faraco, and D.F. De Azevedo, (1964)
General circulatory alterations induced by intravenous infusion of synthetic bradykinin in man.
Circulation 29, 66 - 70.
23. Denker, H.W., and H.Fritz, (1979)
Enzymic characterization of rabbit blastocyst proteinase with synthetic substrates of trypsin-like enzymes.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 107 - 113.
24. De Pasquale, N.P., G. Sanchez, G.E. Burgh, and A.C. Quiroz, (1969)
Effects of bradykinin on the pulmonary vascular bed of the intact dog.
Am. Heart J. 78, 802 - 806.
25. Dorer, F.E., J.R. Kahn, K.E. Lentz, M. Levine, and L.T. Skeggs, (1974)
Hydrolysis of bradykinin by angiotensin converting enzyme.
Circ. Res. 34, 824 - 827.
26. Drent, R.H., (1970)
Functional aspects of incubation in the herring gull.

In The Herring Gull and Its Egg. (Edited by Baerends, G.H. and Drent, R.H.). Behav. Suppl. XVII.

27. Duncker, H.R., (1978)
Development of the avian respiratory and circulatory systems.
In: Piiper, J. (ed.), Respiratory function in birds, adult and embryonic, 260 - 273.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
28. Eltherington, L.G., J. Stoff, T. Hughes, and K.L. Melmon, (1968)
Constriction of human umbilical arteries: interactions between oxygen and bradykinin.
Circ. Res. 22, 747 - 752.
29. Erdös, E.G., (1979)
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein.
Handb. Exp. Pharmacol. 25, Suppl., Springer Verlag, Berlin.
30. Erdös, E.G., and A.F. Wilde, (1970)
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein.
Handb. Exp. Pharmacol. 25, Springer Verlag, Berlin.
31. Ferreira, S.H., and Y.S. Bakhle, (1977)
Inactivation of bradykinin and related peptides in lung.
In: Bakhle, Y.S., and J.R. Vane (eds.) Metabolic functions of the lung (Lung biology in health and disease, vol 4).
Dekker, New York, 33 - 53.
32. Freeman, B.M., (1962)
Gaseous metabolism in the domestic chicken -
II. Oxygen consumption in fullterm and hatching

embryo, with a note on a possible cause for death in shell.

Br. Poult. Sci. 3, 63 - 72.

33. Freeman, B.M., (1974)
Development of the avian embryo - 15. Physiology of hatching.
Chapman and Hall, London. 249 - 260.
34. Freeman, B.M., and B.H. Misson, (1970)
pH, pO₂ and pCO₂ of blood from the foetus and neonate of Gallus domesticus.
Comp. Biochem. Physiol. 33, 763 - 772.
35. Frey, E.K., H. Kraut, und E. Werle (eds.), (1968)
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, S.14.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
36. Frey, E.K., H. Kraut, und E. Werle (eds.), (1968)
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Imhibitoren, S. 114 - 142.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
37. Friberger, P., (1982)
Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems.
Scand. J. clin. Lab. Invest., 42, Supplement 162.
38. Friedli, B., G. Kent, and P.M. Olley, (1973)
Inactivation of bradykinin in the pulmonary vascular bed of newborn and fetal lambs.
Circ. Res. 33, 421 - 427.

39. Fritz, H., and G. Wunderer, (1983)
Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 33 (I), 4, 479 - 494.
40. Geiger, R., (1981)
The kallikrein-kinin-systems.
In: Turk, V., and Lj. Vitale (eds.), Proteinases and their inhibitors, 353 - 376.
Pergamon Press, Oxford.
41. Geiger, R., and H. Fritz, (1981)
Human urinary kallikrein.
Methods in enzymology 80, 466 - 492.
42. Giannopoulos, G., S. Mulay, and S. Solomon, (1972)
Cortisol receptors in rabbit fetal lung.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 411 - 418.
43. Giannopoulos, G., S. Mulay, and S. Solomon, (1973)
Glucocorticoid receptors in lung.
II. Specific binding of glucocorticoids to nuclear components of rabbit fetal lung.
J. Biol.Chem. 248, 5016 - 5023.
44. Gilbert, R.D., J.R. Hessler, D.V. Eitzman, and S. Cassin, (1973)
Effect of bradykinin and alterations of blood gases on fetal pulmonary vascular resistance.
Am. J. Physiol. 225, 1486 - 1489.
45. Görg, A., W. Postel, R. Westermeier, E. Gianazza, and P.G. Righetti, (1980)
Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers.

- J. Biochem. Biophys. Methods 3, 273 - 284.
46. Görg, A., W. Postel, R. Westermeier, P.G. Righetti, and K. Ek, (1981)
One and two dimensional electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels.
LKB Application Note 320.
 47. Gottlieb, G., (1971)
Development of species identification in birds.
University of Chicago Press, Chicago.
 48. Guder, W.L., and O. Wieland, (1969)
Triglyceride breakdown in rat liver. The demonstration of three different lipases.
Biochim. Biophys. Acta. 187, 173 - 185.
 49. Hamburger, V., and R. Oppenheimer, (1967)
Prehatching motility and hatching behaviour in the chick.
J. Exp. Zool. 166, 171 - 204.
 50. Hammel, W., (1983)
Über den Lipidstoffwechsel der Kükenlunge im Verlauf der perinatalen Entwicklungsphase.
Med. Vet. Diss., München.
 51. Heymann, M.A., R.K. Creasy, and A.M. Rudolph, (1973)
Quantitation of blood flow patterns in the foetal lamb in utero.
In: Comline, K.S., G.S. Dawes, and W. Nathanielsz (eds.) Foetal and Neonatal Physiology pp. 129 -135, Proceedings of Sir Joseph Barcroft Centenary Symposium, Cambridge University Press, Cambridge.

52. Heymann, A., A.M. Rudolph, A.S. Nies, and K.L. Melmon, (1969)
Bradykinin production associated with oxygenation of the fetal lamb.
Circ. Res. 15, 521 - 534.

53. Hoffmann, W., and R. Geiger, (1983)
Human tissue kallikrein.
I. Isolation and characterization of human pancreatic kallikrein from duodenal juice.
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 413 - 423.

54. Hoiby, M., A. Arnfinn, and B.R. Ola, (1983)
Oxygen uptake in fowl eggs incubated in air and pure oxygen.
Comp. Biochem. Physiol. 77, 315 - 318.

55. Holmquist, B., P. Bünning, and J.F. Riordan, (1979)
A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme.
Analytical Biochemistry 95, 540 - 548.

56. Kovalcik, V., (1963)
Response of the isolated ductus arteriosus to oxygen and anoxia.
J. Physiol., London 169, 185 - 197.

57. Kraut, H., E.K. Frey, und E. Werle, (1930)
Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse.
Z. Physiol. Chem., 189, 97 -106.

58. Laemmli, U.K., (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680 - 685.

59. Leuenberger, P.J., S.A. Stalcup, R.B. Mellins, L.M. Greenbaum, and G.M. Turino, (1978)
Decrease in angiotensin I conversion by acute hypoxia in dogs (40252).
Proceedings of the society for experimental biology and medicine 158, 586 - 589.
60. Liggins, G.C., and J.A. Kitterman, (1981)
Development of the fetal lung.
In: The fetus and independent life.
Ciba Foundation Symposium 86, 308 - 330.
61. Lind, J., and C.E. Wegelius, (1954)
Human fetal circulation: Changes in the cardiovascular system at birth and disturbances in postnatal closure of the foramen ovale and ductus arteriosus.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 19, 109 - 118.
62. Lindenberg, J.A. A. Brehier, and P.L. Ballard, (1978)
Triiodothyronine nuclear binding in fetal and adult lung and cultured lungs cells.
Endocrinology 103, 1725 - 1731.
63. Marin, L., C. Tordet, and F. Dameron, (1978)
The endocrine control of embryonic lung maturation in the chicken.
I. Morphological and biochemical differentiation of lungs after "in ovo" decapitation.
Anat. Embryol. 152, 223 - 234.
64. Mc Coshen, J.A., and Thompson, R.P., (1968)
A study of the effects of egg separation on hatching time and the source of clicking sounds in the embryo of the domestic chicken.

Canadian Journal of Zoology 46, 243 - 248.

65. Mellins, R.B., D. Davidson, and A. Stalcup, (1980)
Non respiratory functions of the lung in the
perinatal period.
In: Metabolic activities of the lung.
Ciba Foundation Symposium 78, 313 - 331.

66. Melmon, K.L., M.J. Cline, T. Hughes, and A.S. Nies,
(1968)
Kinins: Possible mediators of neonatal circulatory
changes in man.
J. Clin. Invest. 47, 1295 - 1302.

67. Meyrick, B. J.G. Bearn, A.G. Cobb, C.R. Moukhouse,
and L. Reid, (1975)
The effect of the in utero decapitation on the
morphological and physiological development of the
fetal rabbit lung.
J. Anat. 199, 517 - 535.

68. Morishige, W.K., and D.L. Guernsey, (1978)
Triiodothyronine receptors in rat lung.
Endocrinology 102, 1628 - 1632.

69. Mott, J.C., (1975)
The place of the renin - angiotensin system before
and after birth.
Br. Med. Bull. 31, 44 - 50.

70. Movat, H.Z., (1978)
The Kinin System: its relation to blood coagulation,
fibrinolysis and the formed elements of the blood.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 84, 143 -202.

71. Ng, K.K.F., and J.R. Vane, (1968)
Fate of angiotensin I in the circulation.
Nature 218, 144 - 150.
72. Nickel, R., A. Schummer, und E. Seiferle, (1973)
Atmungssystem.
In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 5, 63 - 68
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
73. Overlack, A., K.O. Stumpe, C. Ressel, R. Kolloch, W. Zywozok, and F. Krück, (1980)
Decreased urinary kallikrein activity and elevated blood pressure normalized by orally applied kallikrein in essential hypertension.
Kli. Wo. 50, 37 - 42.
74. Perelman, R.H., M.J. Engle, and P.M. Farrell (1981)
Perspectives on fetal lung development.
Lung 159, 53 - 80.
75. Piiper, J., and P. Scheid, (1981)
Oxygen exchange in metazoa.
In: Gilbert, D.L. (ed.)
Oxygen and living processes, 150 - 176.
76. Pipkin, F.B., and E.M. Symonds, (1977)
Factors affecting angiotensin II concentrations in the human infant at birth.
Clin. Sci. Mol. Med. 52, 449 - 456.
77. Redding, R.A. W.H. Douglas, and M. Stein, (1972)
Thyroid hormone influence upon lung surfactant metabolism.
Science 175, 994 - 996.

78. Romanoff A.L., (1967)
Biochemistry of the avian embryo.
John Wiley, New York, 143 -176.

79. Romijn, C., (1948)
Respiratory movements of the chicken during the
parafoetal period.
Physiol. comp. Oecol. 1, 24 - 28.

80. Romijn, C., and J. Roos, (1938)
The air space of the hen's egg and its changes
during the period of incubation.
J. Physiol., Lond., 94, 365 - 379.

81. Rooney, S.A., Gross, L. Gassenheimer et al., (1975)
Stimulation of glycerolphosphate phosphatidyl-
transferase activity in fetal rabbit lung
by cortisol administration.
Biochim. Biophys. Acta. 398, 433 - 441.

82. Rudolph, A.M., (1969)
The course and distribution of the foetal
circulation.
In: Walstenholme, G.E.W., and U.O.O. Connor (eds.),
J. & A. Churchill, London, 147 - 159.

83. Rudolph, A.M., and M.A. Heymann, (1970)
Circulatory changes during growth in the fetal lamb.
Circ. Res. 26, 289 - 299.

84. Ryan, J.W., J. Roblero, and J.M. Stewart, (1968)
Inactivation of bradykinin in the pulmonary
circulation.
Biochem. J. 110, 795 - 797.

85. Ryan, U.S., J.W. Ryan, C. Whitaker, and A. Chiu, (1976)
Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II).
II. Immunocytochemistry and immunofluorescence.
Tissue & Cell 8, 125 - 145.
86. Sachs, L., (1976)
Statistische Methoden.
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
87. Saugstad, O.D., (1984)
Pathogenetic aspects of respiratory distress syndrome in adults and newborns.
Eur. Surg. Res. 16: Suppl.2, 113 - 119.
88. Saugstad, O.D., A. Harvie, A. Langslet, (1982)
Activation of the kallikrein-kinin system in premature infants with respiratory distress syndrome (RDS).
Acta Paediatr. Scand. 71, 965 - 968.
89. Schwarze, E., und L. Schröder (eds.), (1972)
Kompendium der Geflügelanatomie (2. Aufl.).
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
90. Skeggs, L.T., M.H. Marsh, J.R. Kahn, and N.P. Shumway, (1954)
The existence of two forms of hypertensin.
J. Exp. Med. 99, 275 - 282.
91. Smith, B.T., and J.S. Torday, (1975)
Factors affecting lecithin synthesis by fetal lung cells in culture.
Pediatr. Res. 8, 848 - 851.

92. Spörri, H., (1976)
Atmung.
In: Scheunert, A., A. Trautmann (eds.),
Lehrbuch der Veterinärphysiologie, 591 - 674.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
93. Stalcup, S.A., J.S. Lipset, P.M. Legant, P.J.
Leuenberger, and R.B. Mellins, (1979)
Inhibition of converting enzyme activity by acute
hypoxia in dogs.
J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise
Physiol. 46(2), 227 - 234.
94. Tazawa H., T. Mikami, and C. Yoshimoto, (1971)
Effect of reducing the shell area on the respiratory
properties of chicken embryonic blood.
Resp. Physiol. 13, 352 - 360.
95. Tazawa, H., A.H.J. Visschedijk, J. Wittmann, and J.
Piiper, (1983)
Gas exchange, blood gases and acid-base status in
the chick before, during and after hatching.
Respiratory Physiology 53, 173 - 185.
96. Tullet, S.G., (1975)
Regulation of the avian eggshell porosity.
J. Zool. 177, 399 - 438.
97. Tullet, S.G., and R.G. Board, (1977)
Determinants of the avian eggshell porosity.
J. Zool. 183, 203 - 211.
98. Vince, M.A., (1973)
Some environmental effects on the activity and
development of the avian embryo.
In: Gottlieb, G. (ed.), Behavioral embryology I.

Academic Press, New York, 285 - 323.

99. Vince, M.A., (1973)
Effects of external stimulation on the onset of lung ventilation and the time of hatching in the fowl, duck and goose.
British Poultry Science 14, 389 - 401.
100. Vince, M.A. and J. Green, (1970)
Acceleration of hatching in the domestic fowl.
British Poultry Science 11, 483 - 488.
101. Vince, M.A., (1976)
Behaviour and aeration of the respiratory system in the domestic fowl embryo.
J. Physiol. 263, 465 - 474.
102. Vince, M. B.H. Misson, and B.M. Freeman, (1975)
Blood gas partial pressures and the onset of lung ventilation in the chick embryo.
Comp. Biochem. Physiol. (A) 51, 457 - 463.
103. Vince, M.A., M. Reader, and B. Tolhurst, (1976)
Effects of stimulation on embryonic activity in the chick.
J. of Comp. and Physiol. Psychology, 90, 221 - 230.
104. Vince, M.A., and B.E. Tolhurst, (1975)
The establishment of lung ventilation in the avian embryo: the rate at which the lungs become aerated.
Comp. Biochem. Physiol. 52A, 331 - 337.
105. Visschedijk A.H.J., (1962)
Praenatale Gaswisseling bij de Kijp.
Thesis, University of Utrecht.

106. Visschedijk, A.H.J., (1968a)
The air space and embryonic respiration. 1. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the closing stages of incubation.
Br. Poult. Sci. 9, 173 - 184.
107. Visschedijk, A.H.J., (1968b)
The air space and embryonic respiration. 2. The times of pipping and hatching as influenced by an artificially changed permeability of the shell over the air space.
Br. Poult. Sci. 9, 185 - 196.
108. Visschedijk, A.H.J., (1968c)
The air space and embryonic respiration. 3. The balance between oxygen and carbon dioxide in the air space of the incubating chicken egg and its role in stimulating pipping.
Br. Poult. Sci. 9, 197 - 210.
109. Waaler, B.A., (1961)
The effect of bradykinin in an isolated perfused dog lung preparation.
J. Physiol., London 157, 475 - 483.
110. Wangensteen, O.D., and H. Rahn, (1970/71)
Respiratory gas exchange by the avian embryo.
Respir. Physiol. 11, 31 - 45.
111. Wangensteen, O.D., Wilson D., and H. Rahn, (1969)
Diffusive permeability of egg shell to gases.
Physiologist 12, 385 - 402.
112. Wangensteen, O.D., et al., (1970/71)
Diffusion of gases across the shell of the hen's egg.

Respir. Physiol. 11, 16 - 30.

113. Weber, K., and M. Osborn, (1969)
The reliability of molecular weight determination by
dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.
114. Werle, E., (1936)
Über die Wirkung einiger Kreislaufstoffe beim Huhn
und über eine neue kreislaufaktive Substanz aus
Hühnerkot.
Klinische Wochenschrift 15, 164 - 167.
115. Werle, E., und J. Hürter, (1936)
Über Ornitho-Kallikrein. 1. Mitteilung über
kreislaufaktive Substanzen der Vögel.
Biochemische Zeitung 285, 175 - 191.
116. Werle, E., G. Leysath, (1967)
Über das Molekulargewicht des Plasmakinins von
Vögeln.
Hoppe - Seyer's Z. Physiol. Chem. 348, 352 - 353.
117. Wigger, H.J., and S.A. Stalcup, (1978)
Distribution and development of angiotensin
converting enzyme in the fetal and newborn rabbit.
Lab. Invest. 38, 581 - 585.
118. Windle, W.F., and J. Barcroft, (1938)
Some factors governing the initiation of respiration
in the chick.
Am. J. Physiol. 121, 684 - 691.
119. Wittmann, J., W. Kugler, and H. Kolb, (1984)
Influence of l-thyroxine and thiourea on metabolism
and lung respiration in embryonic chicks.

In: Respiration and metabolism of embryonic vertebrates (ed.: Seymour, R.S.), 311 - 318.

120. Wittmann, J., W. Kugler, and H. Petry, (1983)
Motility pattern and lung respiration of embryonic chicks under the influence of l-thyroxine and thiourea.
Comp. Biochem. Physiol. 75 A, No. 3, 379 - 384.
121. Wittmann, J., and H. Pruy, (1983)
Activation of xanthine dehydrogenase during the prenatal period through l-thyroxine, thiourea and cycloheximide.
Cell Differentiation 13, 77 - 83.
122. Wittmann, J., and A. Weiss, (1981)
Studies on the metabolism of glycogen and adenine nucleotides in embryonic chick liver at the end of incubation.
Comp. Biochem. Physiol. 69 C, 1 - 6.
123. Wittmann, J., and J. Weissenbeck, (1982) ,
The influence of gas composition in the air cell on pipping and liver metabolism in embryonic chicks.
Biochem. Exper. Biol. 16, 383 - 390.
124. Wu, B., Y. Kikkawa, M.M. Orzalesi, et al., (1973)
The effect of thyroxin on the maturation of fetal rabbit lungs.
Biol. Neonate 22, 161 - 168.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil J. Wittmann für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Dank schulde ich auch Frau Dr. I. Schraner für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der chromatographischen und elektrophoretischen Arbeiten, Herrn Dr. W. Kugler für seine Hilfe bei den Blutdruckmessungen und der Registrierung der fetalen Respiration, sowie Herrn Prof. H. Fritz und Herrn Priv. Doz. Dr. R. Geiger für die vielen, bereitwillig gegebenen Hinweise und Anregungen.

Für die Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen möchte ich mich bei Prof. Dr. H. G. Liebich, Institut für Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, bedanken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, besonders Frau B. Hofer, für ihre Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

09.05.1957	Geboren in München als Sohn von August und Hildegard Schmidt, geb. Amann
1963 - 1967	4 Klassen der Volksschule an der Hirschbergstr. in München
1967 - 1976	9 Klassen des Wittelsbacher Gymnasiums in München
25.06.1976	Allgemeine Hochschulreife
1976 - 1982	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians - Universität München
14.07.1982	Approbation zum Tierarzt
1982 - 1983	16 Monate Zivildienst beim Arbeiter - Samariter - Bund München e.V.
seit Dez. 1983	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
August 1984 bis Februar 1985	Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Seit März 1985	Wissenschaftlicher Angestellter am o.g. Institut
Seit 14.06.1985	verheiratet mit Angelika Färber - Schmidt, geb. Färber

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

100-1000

